

Université de Sherbrooke

Contribution de SHP1 dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans le développement du cancer colorectal et de l'inflammation intestinale.

Par
Caroline Leblanc
Programmes de Biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en Biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Décembre 2019

Membres du jury d'évaluation :

Nathalie Rivard, Université de Sherbrooke, programme de Biologie cellulaire
Nathalie Perreault, Université de Sherbrooke, programme de Biologie cellulaire
Pedro Miguel Geraldès, Université de Sherbrooke, programme de Physiologie
Audrey Claing, Université de Montréal, programme de Biochimie

© Caroline Leblanc, 2019

Contribution de SHP1 dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans le développement du cancer colorectal et de l'inflammation intestinale.

Par

Caroline Leblanc

Programme de Biologie cellulaire

SHP1 (Src homology 2 domain-containing phosphatase 1) est une tyrosine phosphatase hautement étudiée dans les cellules hématopoïétiques où elle est décrite comme étant un régulateur négatif de plusieurs voies de signalisation et un suppresseur de tumeur. SHP1 est également exprimé dans les cellules épithéliales, dont l'épithélium intestinal, où son rôle physiologique est peu étudié. Des travaux antérieurs ont déjà montré *in cellulo* que SHP1 semblait réguler l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 en déphosphorylant la β -caténine directement. De plus, un modèle de souris invalidées pour SHP1 dans les cellules épithéliales intestinales (*Shp1*^{CEI-KO}) a montré que la perte d'expression de SHP1 dans les CEIs mène à une augmentation de la prolifération et d'expression de la β -caténine. Ces souris présentent aussi une intestinalomégalie, probablement issue d'une hypertrophie cellulaire. Nous avons donc poursuivi nos travaux afin de mieux caractériser le rôle de SHP1 dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal, mais également dans le développement de maladies telles que le cancer colorectal et l'inflammation intestinale. Ainsi, nous avons utilisé le modèle murin *Shp1*^{CEI-KO}, de même que des cellules cancéreuses colorectales (HCT116 et HT29) sous-exprimant SHP1 grâce à un lentivirus codant pour un shARN ciblant SHP1. Dans ces deux modèles, nous avons observé que la perte, ou la sous-expression, de SHP1 mène à une hypertrophie cellulaire, liée à une augmentation de la signalisation S6K/S6 et S6K/eEF2 et de la synthèse protéique telle que mesurée par la technique SUnSET. Ainsi, le mécanisme impliqué dans l'hypertrophie semble maintenu chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} et dans les lignées cellulaires sous-exprimant SHP1. De plus, nous avons observé que la sous-expression de SHP1 dans des lignées cancéreuses colorectales humaines augmente leur capacité à croître en indépendance d'ancrage. Cependant, les souris *Shp1*^{CEI-KO} ne développent pas de tumeurs intestinales avec l'âge. Tout de même, le croisement des souris *Shp1*^{CEI-KO} avec des souris *Apc*^{Min/+} a révélé que l'absence d'expression de SHP1 dans l'épithélium promeut la polypose intestinale. De plus, suivant un traitement au DSS, nous avons noté que les souris *Shp1*^{CEI-KO} perdent plus de poids que les souris contrôles, sans toutefois présenter d'altérations histologiques au niveau du côlon. En fait, les souris *Shp1*^{CEI-KO} développent une inflammation plutôt iléale en réponse au DSS. En résumé, nos résultats montrent que SHP1 est essentiel au maintien de l'homéostasie de l'intestin grêle particulièrement en contrôlant l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et Wnt/ β -caténine. De plus, l'expression de SHP1 semble prévenir contre le développement tumoral et de l'inflammation dans l'intestin.

Mots clés : SHP1, tyrosine phosphatase, épithélium intestinal, cancer colorectal, inflammation intestinale, Wnt/ β -caténine, PI3K/AKT, homéostasie intestinale.

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION	1
1. Le système digestif.....	1
Section 1.1 : Le tube digestif.....	1
Section 1.2 : L'intestin	2
2. L'épithélium intestinal	3
Section 2.1 Organisation de l'épithélium intestinal	3
Section 2.2 : Prolifération et renouvellement	3
Section 2.3 : Différenciation cellulaire	5
Section 2.4 : Voies de signalisations importantes dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.....	5
2.4.1 Voie Wnt/ β -caténine.....	6
2.4.2 La voie PI3K/AKT	10
2.4.3 La voie des MAP Kinases ERK	12
2.4.4 La voie NOTCH	13
3. Les principales pathologies de l'intestin.....	14
Section 3.1 : Le cancer colorectal	14
3.1.1 Généralités.....	14
3.1.2 La séquence adénome-carcinome.....	15
3.2.3 Importance de la voie Wnt/ β -caténine.....	16
Section 3.2 : Les maladies inflammatoires intestinales.....	18
3.2.1 Généralités.....	18
3.2.2 Causes de la maladie.....	19
4. La tyrosine phosphatase SHP1	21
Section 4.1 : Généralités.....	21
4.1.1 Similitudes et différences avec SHP2.....	21
4.1.2 Régulation.....	22
Section 4.2 : SHP1 : un suppresseur de tumeur	24
4.2.1 Cellules d'origine hématopoïétique.....	24
4.2.2 Cancers du système digestif	25
Section 4.3 : SHP1 et inflammation	26
4.3.1 Modèles Motheaten et Motheaten viable.....	26
4.3.2 Contribution de SHP1 dans l'inflammation	27

Section 4.4 : SHP1 dans l'épithélium intestinal	29
5. Hypothèse et objectifs	31
 II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	33
1. Matériel	33
1.1 Anticorps	33
2. Méthodes	34
2.1 Génération des souris expérimentales	34
2.1.1 Modèles murins	34
2.1.2 Croisements	34
2.1.3 Génotypages	35
2.2 Euthanasie des animaux	36
2.3 Culture de cellules	36
2.4 Lentivirus shSHP1.....	37
2.4.1 Génération de shARN et production lentivirale	37
2.4.2 Infection lentivirale.....	38
2.5 Extraction protéique	38
2.5.1 Souris.....	38
2.5.2 Cellules	38
2.6 Immunobuvardage.....	39
2.7 Extraction d'ARN et RT-PCR.....	39
2.7.1 Extraction d'ARN.....	39
2.7.2 RT-PCR	40
2.8 Circulation et inclusion des tissus	40
2.9 Coloration Alcian Bleu.....	40
2.10 Immunofluorescence	41
2.11 Immunohistochimie.....	41
2.12 Traitement DSS	42
2.12.1 Traitements	42
2.12.2 Index de maladie et score histologique	42
2.13 Évaluation de la synthèse protéique par SUnSET.....	43
2.14 Fractionnement cyto-noyau.....	43
2.15 Culture d'organoïdes	44
2.16 Incorporation d'EdU	45

2.16.1 Cellules	45
1.16.2 Organoïdes.....	46
2.17 Croissance en indépendance d'ancrage.....	46
2.18 Stabilité de Shp1.....	47
2.19 Détermination de l'ubiquitination de SHP1	47
2.19.1 Culture cellulaire	47
2.19.2 Immunoprécipitation contre SHP1	47
2.20 Utilisation de siARN	48
2.21 Spectrométrie de masse	48
2.21.1 Clonage du vecteur pGLAP1-TurboID-SHP1.....	48
2.21.2 Génération des cellules TurboID-SHP1	49
2.21.3 Induction de l'expression de TurboID-SHP1 et précipitation « <i>pull down</i> » Streptavidine.....	49
2.21.4 Préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse.....	50
2.21.5 Analyse des données obtenues par spectrométrie de masse	51
2.2 Analyses statistiques	51
 III. RÉSULTATS.....	 52
Chapitre 1 : SHP1 dans le maintien de l'homéostasie intestinale.....	52
Section 1.1 : SHP1 contrôle la synthèse protéique.....	52
Section 1.2 : Régulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.....	56
1.2.1 Hausse du niveau total et non phosphorylé de la β -caténine dans l'épithélium intestinal des souris <i>Shp1</i> ^{CEI-KO}	58
1.2.2 Hausse de l'expression et de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans le noyau des CEIs des souris <i>Shp1</i> ^{CEI-KO}	59
Section 1.3 : Altération des cellules souches dans l'épithélium des souris <i>Shp1</i> ^{CEI-KO}	62
1.3.1 La perte de SHP1 affecte la population de cellules souches	62
1.3.2 Les organoïdes des souris <i>Shp1</i> ^{CEI-KO} se développent anormalement	63
1.3.3 Une hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine est responsable du phénotype des organoïdes <i>Shp1</i> ^{CEI-KO}	66
Chapitre 2 : Implication de SHP1 dans le cancer colorectal et l'inflammation intestinale.....	68
Section 2.1 : Le cancer colorectal	68
2.1.1 L'expression de <i>PTPN6</i> est réduite dans le cancer colorectal.....	68

2.1.2 Impact de SHP1 sur la croissance de cellules cancéreuses colorectales	69
2.1.3 Les souris <i>Shp1</i> ^{CEI-KO} ne forment pas de tumeurs avec l'âge	71
2.1.4 La perte de SHP1 dans les CEIs des souris <i>Apc</i> ^{Min/+} exacerbe la polypose	74
Section 2.2 : L'inflammation intestinale	76
2.2.1 La susceptibilité du côlon au DSS n'est pas modulée par SHP1	76
2.2.2 Absence totale de phénotype dans le côlon des souris <i>Shp1</i> ^{CEI-KO}	79
2.2.3 L'iléon des souris <i>Shp1</i> ^{CEI-KO} est plus susceptible au DSS	81
Chapitre 3 : Régulation de SHP1	83
3.1 Modulation de l'expression protéique de SHP1 dans le cancer colorectal....	83
3.2 L'expression protéique de SHP1 dans les adénomes des souris <i>Apc</i> ^{Min/+}	86
3.3 Régulation de SHP1 en fonction de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine.	88
3.4 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de SHP1	89
IV. DISCUSSION.....	92
Section 1 : SHP1 régule la croissance cellulaire et la synthèse protéique	92
Section 2 : La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est réprimée par SHP1	94
Section 3 : SHP1 et les cellules souches	98
Section 4 : SHP1 dans la carcinogénèse colorectale	99
Section 5 : Association des phénotypes observés avec les voies PI3K/AKT et Wnt/ β -caténine	102
Section 6 : SHP1, un facteur de susceptibilité à l'inflammation intestinale	104
Section 7 : La perte d'expression de SHP1 n'affecte pas le côlon.....	107
Section 8 : La β -caténine contrôle le niveau de SHP1 de manière post- transcriptionnelle.	108
V. PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS	111
VI. REMERCIEMENTS	117
VII. LISTE DES RÉFÉRENCES	118
VIII. ANNEXE 1	140

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Architecture de l'épithélium intestinal et colique.....	4
Figure 2. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine.....	8
Figure 3. La séquence adénome-carcinome.....	16
Figure 4. Structure de la tyrosine phosphatase SHP1.....	22
Figure 5. La sous-expression de SHP1 affecte la croissance cellulaire.	53
Figure 6. Processus cellulaires dans lesquels SHP1 intervient.....	55
Figure 7. SHP1 contrôle la synthèse protéique.....	57
Figure 8. La perte d'expression de SHP1 dans l'épithélium intestinal mène à une augmentation du niveau d'expression de la β -caténine dans le jéjunum de souris.....	59
Figure 9. La perte d'expression de SHP1 dans l'épithélium intestinal mène à une hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine dans le jéjunum de souris.....	61
Figure 10. L'activité des cellules souches intestinales est affectée par l'absence de SHP1.....	63
Figure 11. Le développement d'organoïdes d'intestin grêle est altéré par l'absence de SHP1 dans les cellules épithéliales intestinales.....	65
Figure 12. L'hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine est responsable de l'altération du développement des organoïdes déficients pour l'expression de SHP1.....	67
Figure 13. L'expression de <i>PTPN6</i> est réduite dans les tumeurs colorectales.....	69
Figure 14. La prolifération des cellules cancéreuses colorectales n'est pas affectée par l'expression de SHP1.....	70
Figure 15. La sous-expression de SHP1 dans des cellules cancéreuses augmente leur potentiel à croître en indépendance d'ancrage.....	71
Figure 16. Le phénotype intestinal des souris <i>Shp1</i> ^{CEI-KO} est maintenu à 15 mois.....	73
Figure 17. La perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal ne semble plus induire d'hyperprolifération cryptale ou de hausse de la β -caténine nucléaire chez des souris âgées de 15 mois.....	74
Figure 18. La perte de SHP1 dans les cellules épithéliales intestinales des souris <i>Apc</i> ^{Min/+} exacerbe le développement de la polypose dans l'intestin grêle.....	75
Figure 19. La perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal ne module pas la sensibilité des souris à développer une colite en réponse au DSS.....	77

Figure 20. La perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal n'affecte pas la récupération des souris suite à un traitement au DSS.....	78
Figure 21. La perte d'expression de SHP1 n'altère pas le phénotype colique des souris âgées de 6 semaines.....	80
Figure 22. Expression de SHP1 et de SHP2 dans l'intestin grêle et le côlon des souris <i>Shp1</i> ^{CEI-KO}	81
Figure 23. L'iléon des souris <i>Shp1</i> ^{CEI-KO} est plus susceptible aux dommages induits par le DSS.....	83
Figure 24. L'expression protéique de SHP1 est augmentée dans les tumeurs colorectales.....	85
Figure 25. L'expression protéique de SHP1 et de la β -caténine est augmentée dans les polypes de souris <i>Apc</i> ^{Min/+}	87
Figure 26. Régulation de l'expression protéique de SHP1 dans un modèle d'expression ectopique de la β -caténine.....	88
Figure 27. L'ubiquitination de SHP1 est diminuée par la surexpression de la β -caténine..	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Amorces de géotypages de souris.....	35
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4E-BP1 :	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
ADAM :	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ANAPC :	<i>Anaphase promoting complex</i>
APC :	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APC/C :	<i>Anaphase promoting complex</i>
Arg :	Arginine
ARN :	Acide ribonucléique
ASCL2 :	<i>Achaete-scute complex homolog 2</i>
ATG16L1 :	<i>Autophagy related 16-like 1</i>
BCA:	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCR :	<i>B cell receptor</i>
BMI1 :	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>
BMP :	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BRCA1:	<i>Breast Cancer 1</i>
BSA :	<i>Bovine serum albumin</i>
β-TrCP :	<i>β-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>
CBC :	<i>Crypt base columnar</i>
CBF-1 :	<i>Centromere-binding protein 1</i>
CBL :	<i>Casitas B-lineage Lymphoma</i>
CCPA:	Conseil canadien de protection des animaux
CD44 :	<i>Cluster of differentiation 44</i>
CDH1 :	Cadhérine-1
CEIs :	Cellules épithéliales intestinales
CFPA :	Conseil facultaire de protection des animaux
CHX:	Cycloheximide
CIMP :	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CIN :	<i>Chromosome instability</i>
CK1a :	Casein Kinase 1α
C-MYC:	<i>Cellular myelocytomatosis oncogene</i>
CREB-1 :	<i>CAMP responsive element binding protein 1</i>
CSF-1 :	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>
CSL :	<i>CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1</i>
DAB :	3,3'-Diaminobenzidine
DAI :	<i>Disease activity index</i>
DHFR :	Dihydrofolate reductase
DKK1 :	Dickkopf1
DLL4 :	<i>Delta like ligand 4</i>
dNTP :	Desoxyribonucleotide triphosphate
DSS :	Dextran sulfate de sodium
DTT :	Dithiothreitol
EDTA :	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EdU :	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
eEF2 :	<i>Eukaryotic elongation factor 2</i>

eEF2K :	<i>Eukaryotic elongation factor 2 kinase</i>
EGF :	<i>Epithelial growth factor</i>
EGFR :	<i>Epithelial growth factor receptor</i>
EPHB3 :	<i>Ephrin type-B receptor 3</i>
ERK :	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ETS :	<i>E26 transformation-specific</i>
FAP :	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
FBS :	<i>Foetal bovine serum</i>
FLT3LG :	<i>Fms Related Tyrosine Kinase 3 Ligand</i>
FRA-1 :	<i>Fos-related antigen 1</i>
GAP :	<i>GTPase activating protein</i>
GLI1 :	<i>Glioblastoma homologue protein 1</i>
Gly :	<i>Glycine</i>
GRB2 :	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3 β :	<i>Glycogen synthase kinase β</i>
GTP :	<i>Guanosine triphosphate</i>
HA :	<i>Hémagglutinine</i>
HES :	<i>Hairy/enhancer of split</i>
HIEC :	<i>Human intestinal epithelial cell</i>
HRP :	<i>Horseradish peroxidase</i>
IL :	<i>Interleukin</i>
IL-R :	<i>Interleukin receptor</i>
IRS :	<i>Insulin receptor substrate</i>
JAK :	<i>Janus-associated kinase</i>
KO :	<i>Knockout</i>
LEF :	<i>Lymphocyte enhancer factor</i>
Leu :	<i>Leupeptine</i>
LGR4,5,6 :	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4,5,6</i>
LOH :	<i>Loss of heterozygosity</i>
loxP :	<i>Locus of X-over P1</i>
LRP5/6 :	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MATH1 :	<i>Mouse atonal homolog 1</i>
MEK1/2 :	<i>Mitogen activated protein kinase kinase 1/2</i>
Met :	<i>Méthionine</i>
MII :	<i>Maladie inflammatoire intestinale</i>
Min :	<i>Multiple intestinal neoplasia</i>
MMP7 :	<i>Matrix metalloproteinase 7</i>
MNK :	<i>MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase</i>
MRPL19 :	<i>Mitochondrial Ribosomal Protein L19</i>
MSI :	<i>Microsatellite instability</i>
mTOR :	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC2 :	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
MTT :	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NF- κ B :	<i>Nuclear factor kappa-B kinase</i>
NICD :	<i>Notch intracellular domain</i>

NLS :	<i>Nuclear localisation signal</i>
NOD2 :	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
OLFM4 :	<i>Olfactomedin 4</i>
PBS :	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR :	<i>Polymerase chain reaction</i>
PKD1 :	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PFA :	<i>Paraformaldéhyde</i>
PI3K :	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PIP :	<i>Phosphatidylinositol phosphate</i>
PKC :	<i>Protéine kinase C</i>
PMSF :	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PRKDC :	<i>Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit</i>
PtdIns :	<i>Phosphatidylinositol</i>
PTEN :	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTPN6 :	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6</i>
PUM1 :	<i>Pumilio homolog 1</i>
PVDF :	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
qPCR :	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RAC1 :	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rag1 :	<i>Recombination activating gene 1</i>
RBP-Jk :	<i>Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region</i>
RHEB:	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RhoA :	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RNF43 :	<i>Ring finger protein 43</i>
rpS6 :	<i>Ribosomal protein S6</i>
rpS6K :	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>
RTKs :	<i>Récepteur à activité tyrosine kinase</i>
RT-PCR :	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
Scid :	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS :	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE :	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser :	<i>Sérine</i>
SH2 :	<i>Src homology 2</i>
shARN :	<i>Short hairpin RNA</i>
SHP1 :	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1</i>
shSCR :	<i>Short hairpin scrambled</i>
siARN :	<i>Small interference RNA</i>
siCTL :	<i>Small interference control</i>
SKF :	<i>Src kinase family</i>
SMAD :	<i>Small mothers against decapentaplegic</i>
SNPs:	<i>Single-nucleotides polymorphisms</i>
SOS :	<i>Son of Sevenless</i>
SOX9 :	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
STAT :	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SUnSET :	<i>Surface sensing of translation</i>

TBP :	<i>TATA binding protein</i>
TCF :	<i>T cell factor</i>
TCGA :	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCR :	<i>T cell receptor</i>
TFA:	Acide trifluoroacétique
TGF:	<i>Transforming growth factor</i>
TLR :	<i>Toll-like receptor</i>
TSC1/2 :	<i>Tuberous Sclerosis Complex 1/2</i>
Txn14b :	<i>Thioredoxin-like protein 4B</i>
Ub :	Ubiquitine
USF1/2 :	<i>Upstream stimulatory factors 1 and 2</i>
UTR :	<i>Untranslated region</i>
Val :	Valine
WNT :	<i>Wingless/Int-1</i>
WT :	<i>Wild-type</i>
ZNRF3 :	<i>Zinc And Ring Finger 3</i>
ZNF281 :	<i>Zinc finger protein 281</i>

I. INTRODUCTION

1. Le système digestif

SECTION 1.1 : LE TUBE DIGESTIF

Le tractus gastrointestinal, ou tube digestif, est composé de plusieurs organes qui vont, ensemble, permettre une digestion maximale des différents aliments ingérés, permettant de fournir l'énergie et les nutriments nécessaires à toutes les cellules (Marieb and Hoehn, 2010). Dans l'ordre, il y a la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon, le rectum et finalement l'anus. La bouche effectue un travail mécanique pour réduire chaque bouchée en petits morceaux. De plus, la présence de salive permet de débiter la digestion chimique de l'amidon grâce à la ptyaline qu'elle contient (Universalis and Articles, 2015). C'est par déglutition que le bol alimentaire va entrer dans le pharynx. Ce dernier est simplement un carrefour permettant à la nourriture d'entrer dans l'œsophage et d'y poursuivre son parcours jusqu'à l'estomac par péristaltisme. À ce niveau, l'estomac contribue à la digestion à la fois de façon mécanique que chimique. En effet, l'estomac crée un brassage grâce aux muscles qui composent sa paroi externe, tout en soumettant le bol alimentaire à une forte concentration d'acide chlorhydrique et à la pepsine. Ensuite, le chyme se dirige vers l'intestin grêle, où la digestion chimique se poursuit grâce à la présence de nombreuses enzymes qui sont déversées par le pancréas dans l'intestin grêle, mais également grâce aux enzymes présentes à la surface de la paroi intestinale. Les muscles lisses entourant l'intestin se contractent et brassent ainsi son contenu, permettant de bien mélanger le chyme avec les enzymes et d'assurer le contact avec la paroi intestinale. Ceci permet d'optimiser la digestion, mais également l'absorption des nutriments (acides aminés, lipides, glucides, vitamines et électrolytes). Ce qui n'aura pas été absorbé par l'intestin grêle se rend ensuite jusqu'au côlon, où une grande partie de l'eau est réabsorbée. Ce qui reste sera éliminé par les fèces. (Marieb and Hoehn, 2010)

SECTION 1.2 : L'INTESTIN

L'intestin est composé de l'intestin grêle et du côlon. L'intestin grêle est formé de trois segments distincts : suivant l'estomac se trouve le duodénum, puis le jéjunum, et pour terminer l'iléon qui se déverse dans le côlon. Au total, l'intestin grêle peut faire de 3 à 6 mètres de long, tandis que le côlon fait environ 1,2 mètres (Collins and Badireddy, 2019; Helander and Fändriks, 2014). Chacun des segments qui composent l'intestin ont leurs particularités. D'abord, le duodénum est la plus petite section de l'intestin et ne mesure que 25 cm environ. Il constitue une sorte de carrefour où se rejoignent le chyme acide de l'estomac, la bile du foie, et les sucs pancréatiques. Ceux-ci contiennent des enzymes digestives et du carbonate afin de neutraliser l'acide de l'estomac (Campbell and Reece, 2007). Vient ensuite le jéjunum, où la majeure partie de l'absorption des nutriments se fait. C'est notamment le cas des acides aminés, des lipides et des glucides. Ce dernier est suivi par l'iléon, qui est principalement responsable d'absorber les nutriments qui n'ont pas été absorbés dans le jéjunum, mais aussi des vitamines et les acides biliaires. Finalement, le côlon est surtout un centre d'absorption d'eau, mais va également absorber quelques vitamines (Campbell and Reece, 2007; Collins and Badireddy, 2019).

L'intestin, tout comme le reste du tube digestif est composé de quatre couches de tissus distinctes qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur, la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse. La séreuse, la plus externe du tube digestif, est composée d'une monocouche de cellules mésothéliales et de tissu conjonctif qui protège les organes plus internes. Sous la séreuse se trouve la musculuse, qui elle-même est composée de deux strates de muscle lisse : une couche longitudinale et une circulaire. Ensemble ces deux couches vont être responsables du péristaltisme. Ensuite vient la sous-muqueuse qui contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des composantes neuronales, des fibroblastes, de même que quelques cellules immunitaires. La couche la plus interne, la muqueuse, est elle-même sous-divisée en trois parties : la *muscularis mucosae*, la *lamina propria*, et l'épithélium. La *muscularis mucosae* est une fine couche de muscle lisse qui permet des contractions et les mouvements locaux. Dessous, se retrouve la *lamina propria* qui est riche en fibroblastes, en capillaires sanguins et en cellules immunitaires. Finalement, la partie la plus interne de la muqueuse, et par le fait même du tube digestif, est l'épithélium. C'est cette dernière couche

qui est en contact direct avec le contenu de la lumière du tube digestif (Collins and Badireddy, 2019; Noah and Shroyer, 2013).

2. L'épithélium intestinal

SECTION 2.1 ORGANISATION DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL

L'épithélium intestinal est composé d'une monocouche de cellules qui agit comme barrière physique entre le contenu luminal et le soi. Celle-ci présente une étanchéité sélective au contenu du tube digestif (Allaire et al., 2018). L'épithélium, au niveau de l'intestin grêle, est organisé en unités fonctionnelles d'axes crypte-villosité, tandis que dans le côlon, l'épithélium n'est composé que de cryptes et d'épithélium de surface (Fig. 1). Dans l'intestin grêle, la crypte est considérée comme étant le compartiment prolifératif puisqu'elle contient entre autres les cellules souches et les cellules progénitrices prolifératives. De son côté, la villosité est considérée comme le compartiment différencié puisqu'elle ne contient que des cellules pleinement différenciées et fonctionnelles (Clevers, 2013; Crosnier et al., 2006).

SECTION 2.2 : PROLIFÉRATION ET RENOUVELLEMENT

Chaque cellule qui compose l'épithélium intestinal provient des cellules souches présentes au fond des cryptes. Plus précisément, il existe deux principaux groupes de cellules souches : les cellules souches de type CBC (*crypt base columnar cell*) dites actives et présentes au fond de la crypte, intercalées avec les cellules de Paneth, et les cellules souches de réserve, quiescentes, qui sont localisées à la position +4 dans la crypte (Barker et al., 2008; Yan et al., 2012). Ces deux populations de cellules souches distinctes vont exprimer des marqueurs différents. En effet, les cellules souches quiescentes +4 expriment le gène *BMI1* (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*), tandis que les cellules CBC souches expriment les gènes *LGR5* (*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*) et *OLFM4* (*Olfactomedin 4*) (van der Flier et al., 2009; Yan et al., 2012). Ainsi, en conditions physiologiques normales, toutes les cellules épithéliales intestinales (CEIs) sont issues des cellules souches dites LGR5+ puisque les cellules BMI1+ ne se réveillent que suivant des

blessures graves à l'épithélium (Yan et al., 2012), lorsque les cellules souches CBC sont elles-mêmes affectées (Tian et al., 2011).

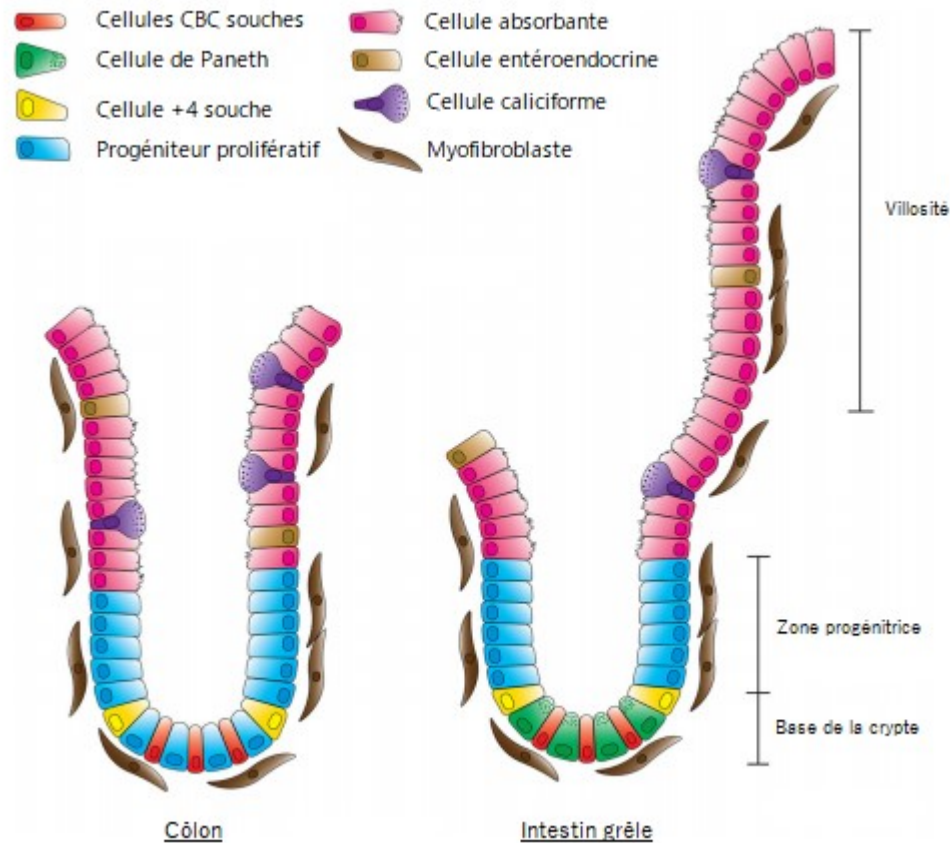


Figure 1. Architecture de l'épithélium intestinal et colique.

L'épithélium intestinal est organisé en cryptes et épithélium de surface dans le côlon, et dans l'intestin grêle, il est organisé en axe crypte-villosité. Les cellules souches au fond des cryptes donnent naissance à tous les types cellulaires qui constituent cet épithélium, soit les cellules absorbantes, les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines. De plus, dans l'intestin grêle, il y a les cellules de Paneth qui sont présentes au fond des cryptes, intercalées avec les cellules souches CBC. Modifié de Ma et al., 2016. Image libre d'accès.

Les cellules issues de la division asymétrique des cellules souches sont des cellules progénitrices prolifératives qui, comme leur nom l'indique, prolifèrent. Ces cellules vont à leur tour donner naissance à d'autres cellules dont la majorité vont migrer vers la sortie de la crypte où elles vont arrêter de proliférer et se différencier. À l'atteinte de la base des villosités, les cellules vont être complètement différenciées et pleinement fonctionnelles. Elles vont poursuivre leur migration jusqu'à l'atteinte de l'apex des villosités, puis se

détacher pour mourir par anoïkose (Delgado et al., 2016). Certaines cellules vont plutôt migrer vers le bas de la crypte pour se localiser autour des cellules souches. Au final, l'épithélium intestinal se renouvelle aux 3 à 5 jours chez la souris (Clevers, 2013).

SECTION 2.3 : DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

L'épithélium intestinal est composé de différents types de cellules qui vont occuper des fonctions bien précises tout au long de leur vie. Ainsi, lorsque les cellules progénitrices arrivent près de la sortie de la crypte, elles vont se déterminer puis se différencier en un type cellulaire bien précis. Il y a deux catégories de cellules : les cellules absorbantes et les cellules sécrétrices. Les cellules absorbantes sont évidemment les plus abondantes considérant le rôle de l'intestin dans la digestion. Dans l'intestin grêle, les cellules absorbantes sont appelées entérocytes, alors que dans le côlon, ce sont des colonocytes. Ces cellules vont bien entendu être responsables de l'absorption des nutriments, des vitamines et de l'eau. Parmi les cellules sécrétrices, il y a d'abord les cellules caliciformes qui sont responsables de sécréter un mucus protecteur à l'épithélium. Ensuite, il y a les cellules entéroendocrines qui sécrètent différentes hormones permettant de réguler la digestion. Puis, il y a les cellules de Paneth qui sécrètent des peptides antimicrobiens et des facteurs de croissance qui participent à l'établissement la niche des cellules souches (Clevers and Bevins, 2013; Sato et al., 2011). Il s'agit là du seul type de cellules différenciées qui n'est pas présent dans les villosités, mais qui est localisé au fond des cryptes, intercalé avec les cellules souches. Finalement, il y a les cellules Tuft qui semblent avoir un rôle dans la perception du contenu luminal, dans la réponse immunitaire de type 2 (Gerbe et al., 2016) et dans le maintien de la niche des cellules souches (Middelhoff et al., 2017).

SECTION 2.4 : VOIES DE SIGNALISATIONS IMPORTANTES DANS LE MAINTIEN DE L'HOMÉOSTASIE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL

Puisque l'épithélium intestinal est un organe à renouvellement très rapide, l'équilibre entre la prolifération, la différenciation et la survie doit être très finement régulé. Cette régulation se fait à différents niveaux par le travail conjoint de nombreuses voies de signalisation.

2.4.1 Voie Wnt/ β -caténine

Bien qu'il en soit rarement discuté, il existe trois voies de signalisation différentes dépendantes des facteurs WNTs (*Wingless/Int-1*) : la voie canonique dépendante de la β -caténine, et deux voies non-canoniques qui sont indépendantes de la β -caténine. Les deux voies dites non-canoniques sont i) « *Planar Cell Polarity* » qui contrôle la polarisation cellulaire au sein d'un tissu via la régulation des petites GTPases RAC1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) et RHOA (*Ras homolog gene family, member A*) (Butler and Wallingford, 2017), et ii) WNT/ Ca^{2+} qui signale par des protéines G trimériques pour moduler l'activité de la phospholipase C (hydrolysant le PIP2) et conséquemment, la mobilisation du calcium intracellulaire (Niehrs, 2012). La voie de signalisation WNT qui nous intéresse particulièrement dans l'épithélium intestinal, c'est la voie canonique qui a pour effecteur principal, la β -caténine. Ainsi, toutes les fois où il sera mention de la voie Wnt/ β -caténine, ce sera en référence à la voie canonique.

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est activée par des facteurs WNTs extracellulaires (WNT2, WNT2b, WNT3, WNT3a et WNT8) (Tortelote et al., 2017) qui peuvent être sécrétés par les cellules de Paneth et par les cellules du mésenchyme (Miller, 2002; Sato et al., 2011). En l'absence de stimulation par un facteur WNT, la β -caténine cytoplasmique est liée à un complexe appelé complexe de dégradation formé notamment des protéines d'échafaudage AXINE et APC (*Adenomatous polyposis coli*) ainsi que des kinases GSK3 β (*Glycogen synthase kinase β*) et CK1 α (*Casein Kinase 1 α*). Dans ce complexe, CK1 α est capable de phosphoryler la sérine 45 de la β -caténine, ce qui entraîne des phosphorylations par GSK3 β sur les sérines 33 et 37, de même que sur la thréonine 41 (Fig.2A). Ces phosphorylations successives de la β -caténine forment un phosphodégrogon reconnu par la E3 ubiquitine ligase β -TrCP (*β -transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*), qui procède à son ubiquitination, ce qui mène à sa dégradation par le protéasome (Stamos and Weis, 2013; Wu and He, 2006). Par contre, la liaison d'un facteur WNT au récepteur FRIZZLED et au co-récepteur LRP5/6 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein*) provoque la formation du complexe trimérique WNT-FRIZZLED-LRP5/6 qui recrute la protéine DISHEVELLED qui se polymérise pour se lier à l'AXINE. LRP5/6

est ensuite phosphorylé par CK1 α et GSK3 β , libérant la β -caténine dans le cytoplasme (Nusse, 2012). N'étant ainsi plus phosphorylée, la β -caténine est dite stabilisée et transloque au noyau où elle s'associe avec des membres de la famille TCF/LEF (*T cell factor/Lymphocyte enhancer factor*) (principalement TCF4 dans les cellules épithéliales intestinales) (van Es et al., 2012) (Fig. 2B). Ensemble ces deux protéines forment un facteur de transcription actif capable de déplacer le répresseur Groucho, et capable de transcrire différents gènes cibles. Parmi ceux-ci figurent plusieurs gènes associés au contrôle de la prolifération tels que *AXIN2*, *MYC* (*myelocytomatosis oncogene*) et *CNND1* (*cycline D1*) (He et al., 1998; Jho et al., 2002; Tetsu and McCormick, 1999), des gènes exprimés dans les cellules souches tels que *LGR5* et *ASCL2* (*Achaete-scute complex homolog 2*) (Barker et al., 2007; Schuijers et al., 2015), et des gènes associés à la différenciation et à la fonction des cellules de Paneth dont *SOX9* (*sex determining region Y-box 9*) et *EPHB3* (*EphrineB3*) (Batlle et al., 2002; Blache et al., 2004).

Il existe nombre d'agonistes et d'antagonistes qui permettent de régulariser le niveau d'activation de la voie Wnt/ β -caténine. Notamment, il y a les membres de la famille des R-Spondines, agonistes des récepteur membranaires LGR4,5,6 qui potentialisent la signalisation Wnt/ β -caténine en liant les récepteurs FRIZZLED (Kazanskaya et al., 2004; de Lau et al., 2011). En fait, la liaison des récepteurs LGR aux récepteurs FRIZZLED empêche les E3 ubiquitine ligases transmembranaires RNF43 (*Ring finger protein 43*) et ZNRF3 (*Zinc and ring finger 3*) de les lier et de les internaliser (Hao et al., 2016; Jiang et al., 2015). Il y a aussi NOGGIN, un antagoniste de la signalisation par les BMPs (*bone morphogenetic protein*), exprimé par les myofibroblastes à la base de la crypte (Haramis et al., 2004). Puisque la signalisation des BMPs inhibe la signalisation Wnt/ β -caténine (He et al., 2004), l'expression de NOGGIN permet de maintenir l'activation de cette voie de signalisation dans l'environnement des cellules souches. DKK1 (*Dickkopf1*) de son côté fonctionne comme un antagoniste des récepteurs LRP5/6, inhibant la signalisation Wnt/ β -caténine (Semenov et al., 2001).

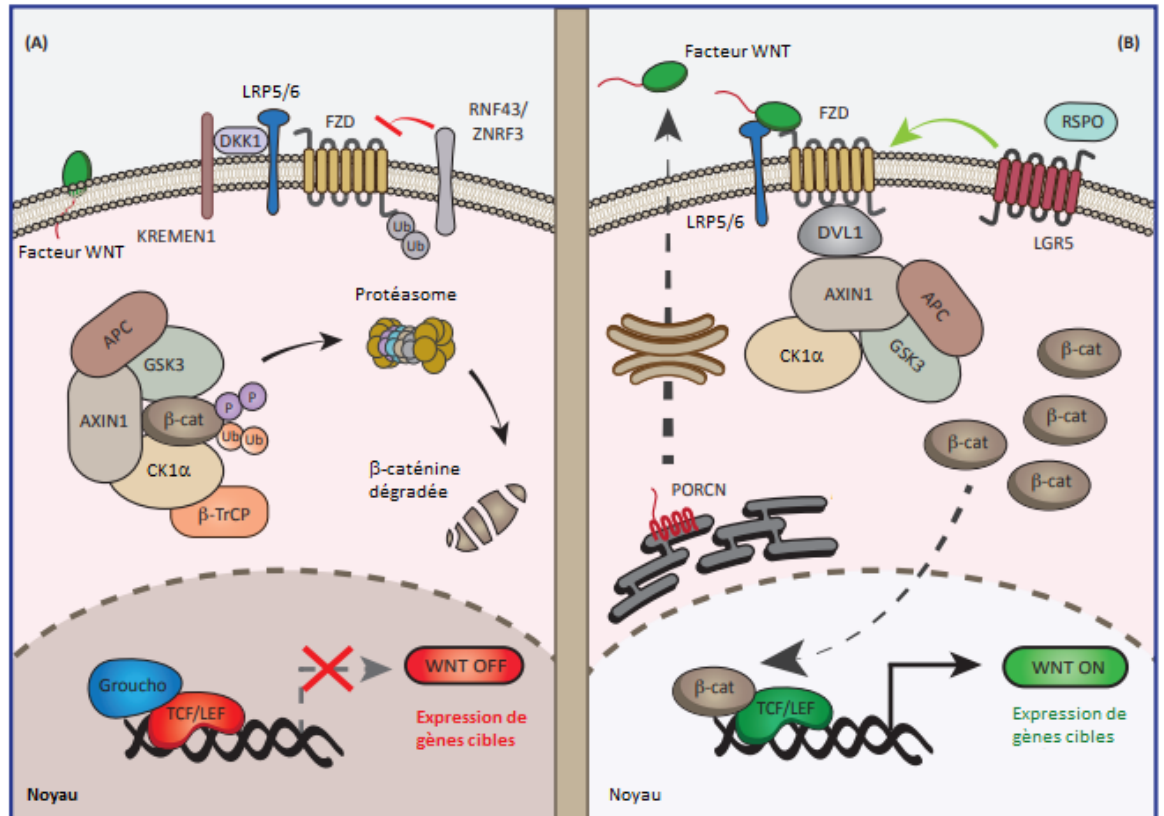


Figure 2. La voie de signalisation Wnt/β-caténine.

A. Voie « OFF ». En absence de liaison d'un facteur WNT au récepteur FRIZZLED, la β-caténine cytoplasmique est séquestrée par un complexe de dégradation composé des protéines APC, AXINE1, des kinases CK1α et GSK3β, de même que de la E3 ubiquitine ligase β-TrCP. Ce complexe permet la phosphorylation de la β-caténine, menant à son ubiquitination et éventuellement sa dégradation par le protéasome. La transcription de gènes cibles est bloquée par des répresseurs tels que Groucho. **B. Voie « ON ».** La liaison d'un facteur WNT à son récepteur FRIZZLED recrute DISHEVELLED, qui permet d'apporter le complexe de dégradation à la membrane, ce qui le déstabilise. La β-caténine n'est alors plus prise en charge ni dégradée par le protéasome. Ainsi, la β-caténine est stabilisée et peut transloquer au noyau. Elle y délodge alors Groucho pour s'associer avec des membres de la famille TCF/LEF. Ensemble, ils forment un facteur de transcription actif qui transcrit différents gènes cibles notamment impliqués dans la prolifération. Modifiée de Galluzzi et al., 2019. (#4638251195389).

La voie Wnt/β-caténine est reconnue pour être cruciale à l'homéostasie de l'épithélium intestinal, et ce, à plusieurs niveaux. D'abord, l'activation de cette signalisation est nécessaire à l'apparition et à la différenciation des cellules de Paneth, présentes au fond des cryptes de l'intestin grêle. En effet, une activation aberrante de la voie Wnt/β-caténine

suivant par exemple une délétion de *Apc* chez la souris mène à une augmentation importante du nombre de cellules de Paneth, et même à une métaplasie de ce type cellulaire dans le côlon (Andreu et al., 2008). De la même façon, augmenter la signalisation Wnt/ β -caténine dans des organoïdes avec des doses croissantes de R-Spondine induit une augmentation croissante du nombre de cellules de Paneth (Farin et al., 2012). À l'inverse, les souris déficientes pour TCF4, ou exprimant un allèle hypomorphique de la β -caténine, présentent une absence de cellules de Paneth au fond des cryptes (Andreu et al., 2008; van Es et al., 2005a, 2012). De façon intéressante, la voie Wnt/ β -caténine est également responsable de la localisation appropriée des cellules de Paneth au fond des cryptes. En effet, l'expression des récepteurs Ephrine B2 (EphB2) et Ephrine B3 (EphB3) est sous le contrôle de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. EphB2 est exprimé par les cellules prolifératives, donc plus fortement au fond des cryptes. Son expression suit tout de même un gradient décroissant à l'approche du haut de la crypte. L'expression de EphB3 est quant à elle réservée à la surface des cellules de Paneth. Pour ce qui est de leur ligand Ephrine B1, il est exprimé plus fortement au haut de la crypte avec un gradient inverse à EphB2 (Batlle et al., 2002). Une compartimentalisation s'établit donc suivant la liaison d'un des récepteurs à son ligand, puisque ceci entraîne une répulsion des cellules (Park et al., 2011; Zimmer et al., 2003). Ainsi, si l'expression du récepteur EphB3 est abolie chez la souris, les cellules de Paneth sont délocalisées. Le phénotype est d'ailleurs exacerbé lors de la double délétion des gènes *EphB2* et *EphB3* chez la souris (Batlle et al., 2002).

Un autre rôle crucial qui est attribué à la signalisation Wnt/ β -caténine est le maintien de la prolifération et de la survie des cellules souches. Dans l'intestin grêle, la niche des cellules souches est maintenue par l'activité des cellules de Paneth, dont la présence dépend de la voie Wnt/ β -caténine tel que mentionné plus tôt. De plus, les cellules de Paneth produisent et sécrètent différents facteurs de croissance dont WNT3, l'EGF (*epithelial growth factor*), le TGF- α (*transforming growth factor- α*) et DLL4 (*delta like ligand 4*, un ligand des récepteurs NOTCH) qui stimulent la prolifération et la survie des cellules souches (Sato et al., 2011). Il est aussi connu que le mésenchyme adjacent à l'épithélium du fond des cryptes sécrète lui aussi des facteurs WNT pour soutenir cette niche (Farin et al., 2012; Miller, 2002). Au niveau du côlon, les cellules souches sont également présentes au fond des

cryptes, qui sont dépourvues cependant des cellules de Paneth. Par contre, les cellules souches y sont tout de même intercalées avec des cellules sécrétrices CD24+, un marqueur qui est également exprimé par les cellules de Paneth (Sato et al., 2011). Il a donc été suggéré que ces cellules feraient office de cellules de Paneth dans le côlon, par contre, aucune étude n'a encore montré que l'épithélium du côlon pouvait sécréter des facteurs WNT fonctionnels (Miyoshi, 2017). L'apport en facteurs WNT de la niche est ainsi essentiellement maintenu par le mésenchyme sous-jacent à l'épithélium. D'ailleurs, il a été récemment montré que ce rôle est tenu par un sous-type particulier de cellules du mésenchyme qui expriment GLI1 (*glioblastoma homologue protein 1*) (Degirmenci et al., 2018). Ainsi, tous ces facteurs relâchés à proximité des cellules souches permettent de maintenir la niche (van Es et al., 2012). Lorsque la signalisation Wnt est augmentée par l'inactivation d'*Apc* ou par la suractivation de la β -caténine chez la souris, il y a une expansion du compartiment souche qui est observé (Xian et al., 2017). À l'inverse, la perte d'expression de la β -caténine dans l'épithélium intestinal ou la surexpression de l'antagoniste DKK1 mènent à la perte des cellules souches (Fevr et al., 2007; Pinto et al., 2003).

2.4.2 La voie PI3K/AKT

La signalisation PI3K/AKT (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) est activée par de nombreux facteurs de croissance qui signalent par des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs). En effet, la liaison d'un ligand à son RTK induit la phosphorylation de tyrosines présentes dans la queue intracellulaire du RTK, ce qui crée des sites d'ancrage pour différentes protéines de signalisation. Ainsi, la sous-unité régulatrice de la PI3K peut s'y lier directement via ses domaines SH2 (*Src homology 2*), ou indirectement par l'intermédiaire de protéines d'échafaudage telles que IRS (*insulin receptor substrate*). En effet, la PI3K est composée de 2 sous-unités : une sous unité régulatrice p85 qui contient 2 domaines SH2, et une sous-unité catalytique p110 (Songyang et al., 1993). Lorsqu'activée, la PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol(4,5)phosphophate-2 (PtdIns(4,5) P_2 , ou PIP2) en phosphatidylinositol(3,4,5)phosphate-3 (PtdIns(3,4,5) P_3 ou PIP3). Cette étape est renversée par la phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) qui déphosphoryle le PtdIns(3,4,5) P_3 en PtdIns(4,5) P_2 (Johnston and Raines, 2015). L'accumulation de PtdIns(3,4,5) P_3 permet de recruter à la membrane plasmique l'effecteur principal de cette

voie de signalisation, AKT, mais également un de ses activateurs, PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*). En effet, pour être activé, AKT doit être d'abord phosphorylé par PDK1 sur sa thréonine 308, puis sur sa sérine 473 par le complexe mTORC2 (Dangelmaier et al., 2014; Fresno Vara et al., 2004; Scoville et al., 2008). Par la suite, AKT est capable de phosphoryler à son tour une multitude de substrats permettant d'agir entre autres sur la survie cellulaire en phosphorylant BAD (Datta et al., 1997), sur la progression du cycle cellulaire via la phosphorylation de p27^{Kip1} (Liang et al., 2002; Shin et al., 2002) et sur la traduction en phosphorylant TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) (Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002). Cette dernière phosphorylation entraîne en effet l'inhibition du complexe TSC1/2, ce qui entraîne l'activation de RHEB (*Ras homolog enriched in brain*) (lié au GTP (*Guanosine triphosphate*)) et de mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Une fois mTOR activé, on observe la phosphorylation la kinase S6 et de l'inhibiteur d'initiation de la traduction 4E-BP (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) (Inoki et al., 2002; McManus and Alessi, 2002). La kinase S6 phosphoryle rpS6 (*ribosomal protein S6*), une protéine comprise dans la sous-unité ribosomale 40S et qui est suspectée de jouer un rôle important dans le contrôle de la traduction. Par contre, des travaux ont montré qu'il n'y avait pas de différence dans la traduction chez des souris « knock-in » exprimant rpS6 non-phosphorylable (Ruvinsky and Meyuhas, 2006; Ruvinsky et al., 2005). Néanmoins, une autre des cibles de la kinase S6 est « *l'elongation factor 2 kinase* » (eEF2K). Cette kinase inhibe « *l'elongation factor 2* » (eEF2), ce qui ralentit l'élongation de la traduction. Ainsi, la phosphorylation de eEF2K sur la sérine 366 par la kinase S6 inhibe son activité, ce qui permet à eEF2 d'être pleinement actif et de favoriser la traduction (Browne and Proud, 2004; Wang et al., 2001, 2014).

De manière intéressante, il existe un lien entre l'activation de la voie PI3K/AKT et celle de la voie Wnt/ β -caténine. En effet, parmi les nombreuses cibles de AKT se trouve la GSK3 β qui, lorsque phosphorylée sur sa sérine 9, est inhibée (Cross et al., 1995). Ceci promeut donc la stabilité de la β -caténine. De plus, la β -caténine elle-même peut être phosphorylée (sur la sérine 552) par AKT (Fang et al., 2007). La phosphorylation de la sérine 552 de la β -caténine favorise sa localisation nucléaire, et ainsi son activité transcriptionnelle (Chowdhury et al., 2015; Fang et al., 2007; Lee et al., 2010).

La régulation de la signalisation PI3K/AKT se fait principalement par la lipide phosphatase PTEN. Celle-ci est connue comme étant un suppresseur de tumeur dans de nombreux tissus, puisque sa perte mène à une hyperactivation soutenue de la signalisation PI3K/AKT. C'est d'ailleurs le cas dans le mésenchyme de l'intestin et du côlon où la délétion de PTEN entraîne la formation spontanée de tumeurs (Langlois et al., 2019). En ce qui concerne l'épithélium intestinal cependant, il a été rapporté que la perte de PTEN dans l'épithélium intestinal chez la souris mime le syndrome de Cowden, c'est-à-dire que ces souris développent des lésions tumorales dans leur intestin (Marsh Durban et al., 2014). Cependant, d'autres groupes de recherche ont montré que la perte épithéliale de PTEN à elle seule ne suffit pas à engendrer la formation de tumeurs, mais que chez les souris *Apc*^{Min/+}, elle entraîne toutefois une augmentation de la polypose (Langlois et al., 2009; Marsh et al., 2008). De plus, il a été montré que la perte de PTEN dans l'épithélium intestinal murin engendre des modifications dans la détermination des cellules épithéliales intestinales puisque les cellules caliciformes semblent favorisées au détriment des cellules entéroendocrines. Finalement, ces souris présentent une intestinalomégalie associée à une augmentation de la prolifération, indiquant que la signalisation PI3K/AKT régule également l'architecture de l'intestin (Langlois et al., 2009).

2.4.3 La voie des MAP Kinases ERK

La voie de signalisation ERK/MAPK (*extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase*) est activée par des facteurs de croissance, tel que l'EGF, qui lient leur RTK. Suite à l'activation et la phosphorylation des RTKs, il y a recrutement d'un certain nombre de protéines intracellulaires contenant un domaine SH2 capable de reconnaître ses tyrosines phosphorylées. Une de ces protéines est la protéine adaptatrice GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) capable de lier le facteur d'échange SOS (*son of sevenless*) qui active la petite protéine G RAS ancrée à la membrane (Chardin et al., 1993). Ainsi active, la protéine RAS recrute et active la kinase RAF qui va par la suite phosphoryler les kinases MEK1/2 (*mitogen activated protein kinase kinase 1/2*) sur les sérines 217 et 221. À leur tour, MEK1/2 phosphorylent les kinases ERK1/2 sur la thréonine 202 et la tyrosine 204. Une fois actives, les kinases ERK1/2 phosphorylent une multitude de substrats cytoplasmiques (dont MNK (*MAP kinase-interacting serine/threonine-protein*

kinase) et p90S6K (Esnault et al., 2015; Hou et al., 2012)) et nucléaires (dont FRA-1 (*Fos-related antigen 1*) et C-MYC (Benassi et al., 2006; Casalino et al., 2003)), régulant ainsi de nombreux processus cellulaires (Huo et al., 2015; Mei et al., 2013; Sun et al., 2019). Notre équipe a d'ailleurs déjà montré que l'activation de la signalisation RAS/ERK MAPK était essentielle à la prolifération des cellules épithéliales intestinales en culture et que l'inhibition de cette voie était nécessaire pour permettre leur différenciation entérocytaire (Aliaga et al., 1999; Lemieux et al., 2011; Paquin et al., 2013). De manière intéressante, une forte activité des ERK est observée dans le noyau des cellules progénitrices intestinales (Aliaga et al., 1999). L'activation de cette voie s'avère aussi cruciale pour maintien du compartiment cryptal prolifératif chez la souris (Kabiri et al., 2018; Wong et al., 2012).

2.4.4 La voie NOTCH

La signalisation NOTCH est activée par la liaison d'un récepteur NOTCH (NOTCH 1, 2, 3 et 4) avec un de ses ligands « *Delta like* » (DLL1, 3 et 4) ou JAGGED1 et 2, eux aussi transmembranaires et présents sur des cellules adjacentes. Cette liaison récepteur/ligand permet un clivage extracellulaire de NOTCH par une protéase ADAM (« *a disintegrin and metalloprotease* »), qui est suivi par un clivage intracellulaire de NOTCH par la γ -sécrétase. Ceci permet la libération du domaine intracellulaire « *NOTCH intracellular domain* » (NICD) qui va transloquer au noyau et se lier avec CSL (*CBF-1/RBP-J κ , Su(H), Lag-1*) afin de former un facteur de transcription actif, déplaçant des co-répresseurs tel que MTG8, et recrutant des co-activateurs dont *Mastermind*. Cette voie de signalisation, lorsque activée, va permettre la transcription de différents gènes cibles dont HES1 (*hairy and enhancer of Split 1*) et HES5 (Noah and Shroyer, 2013).

Dans l'épithélium intestinal, la voie de signalisation NOTCH joue un rôle important dans la prolifération des cellules souches et dans la différenciation des cellules absorbantes. Il a été démontré que la voie de NOTCH est impliquée dans le maintien du compartiment prolifératif et est très active dans les cellules souches de l'épithélium intestinal (Brink et al., 2001). L'inhibition de la signalisation de NOTCH chez la souris par l'inhibition de la γ -sécrétase entraîne un arrêt de la prolifération et l'induction de la différenciation en cellules sécrétrices (van Es et al., 2005b). Inversement, l'activation constitutive de NOTCH cause la

perte des cellules sécrétrices ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire (Fre et al., 2005). De plus, NOTCH promeut la différenciation des cellules absorbantes via les facteurs HES qui inhibent l'expression de MATH1 (*Mouse atonal homolog 1*), un facteur nécessaire à la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice (Sancho et al., 2015). Ainsi, les ligands DLL1 et DLL4 sont exprimés sur les cellules sécrétrices pour permettre l'activation de la voie NOTCH dans les cellules voisines. C'est entre autres ainsi que les cellules de Paneth contribuent au maintien des cellules souches. En effet, la présence des ligands à la surface de ces cellules permet d'activer la voie NOTCH dans les cellules souches, maintenant leur état indifférencié (van Es et al., 2005b; VanDussen et al., 2012). Ainsi, la voie de signalisation de NOTCH est impliquée dans la régulation des processus de prolifération/différenciation et de détermination des cellules de l'épithélium intestinal.

3. Les principales pathologies de l'intestin

L'homéostasie de l'intestin est maintenue par de nombreuses voies de signalisation qui sont très finement régulées. Le moindre dérèglement dans la signalisation peut engendrer des irrégularités dans différents processus cellulaires et ainsi engendrer des effets considérables qui peuvent mener à l'apparition de différentes pathologies.

SECTION 3.1 : LE CANCER COLORECTAL

3.1.1 Généralités

Le cancer colorectal se forme à partir de l'épithélium intestinal et comme son nom l'indique, va surtout affecter le côlon et le rectum. Il peut être de nature héréditaire comme dans les cas du syndrome de polypose familiale FAP (*familial adenomatous polyposis*) et de la maladie de Lynch, mais plus de 70% des cancers colorectaux sont d'origine sporadique et vont se développer après 50 ans (Recio-Boiles et al., 2019). Plusieurs facteurs de risque sont connus tels que la diète, l'environnement, les habitudes de vie, l'obésité, l'ingestion d'alcool et le tabagisme (Slattery, 2000). Il existe différents stades de cancers colorectaux, classés selon leur degré de progression. Il y a d'abord le stade 0 où les cellules tumorales, qui ne

sont pas encore cancéreuses, sont encore localisées dans la muqueuse et dites *in situ*. Le stade 1 représente une tumeur qui est encore restreinte au tissu d'où elle émerge, soit l'épithélium dans ce cas-ci. Au stade 2, la tumeur est un peu plus développée a commencé à atteindre les différentes couches qui constituent les parois du côlon. Le stade 3 est caractérisé par une large tumeur qui commence à s'étendre aux tissus adjacents et aux ganglions lymphatiques. Finalement, le 4^e et dernier stade, c'est lorsqu'il y a présence de métastases qui se sont développées dans d'autres organes tels que le foie et les poumons (Colorectal Cancer Alliance).

Le cancer colorectal peut se développer selon trois voies de carcinogénèse différentes : 1- le cancer colorectal associé à une instabilité chromosomique (CIN) qui est le plus fréquent et représente 80% des cas; 2- Le cancer colorectal associé à une instabilité des microsatellites (MSI) causant une déficience dans les mécanismes de réparation d'ADN; 3- le cancer colorectal de type « *serrated* », nommé en fonction de l'apparence des tumeurs, et caractérisé par la méthylation des îlots CpG (CIMP) (Mundade et al., 2014). Pour le présent travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la voie la plus commune, soit la voie de l'instabilité chromosomique.

3.1.2 La séquence adénome-carcinome

La voie de carcinogénèse colorectale de l'instabilité chromosomique est bien caractérisée quant aux événements qui s'enchaînent pour transformer une cellule épithéliale normale en adénome, puis en adénocarcinome (Fig. 3). En fait, le développement de ce type de tumeur implique l'activation de proto-oncogènes et l'inactivation de suppresseurs de tumeurs tel qu'initialement proposé par Vogelstein et son équipe dès la fin des années 1980 (Vogelstein et al., 1988).

Le développement de ce type de cancer colorectal implique la perte de fonction du gène *APC* ce qui amène l'hyperactivation de la signalisation Wnt/ β -caténine (Fig. 3). Ceci cause l'hyperprolifération des cellules souches transformant l'épithélium normal en un adénome précoce. Une instabilité du génome s'installe alors, ce qui provoque l'apparition subséquente de mutations dans les gènes *KRAS* puis *SMAD4* (*small mothers against decapentaplegic 4*) permettant respectivement la progression vers un adénome intermédiaire

puis vers un adénome tardif (Arrington et al., 2012; Drabsch and ten Dijke, 2012; Miyaki et al., 1999). La formation du carcinome se produit lorsque le gène suppresseur de tumeur *TP53* est inactivé à son tour (Fig. 3) (Fearon, 2011; López et al., 2012). Finalement, d'autres mutations supplémentaires, comme par exemple dans le gène *CDH1*, qui code pour la cadhérine-E, peuvent survenir contribuant à la formation de métastases (Giles et al., 2003; Sawa et al., 2016).

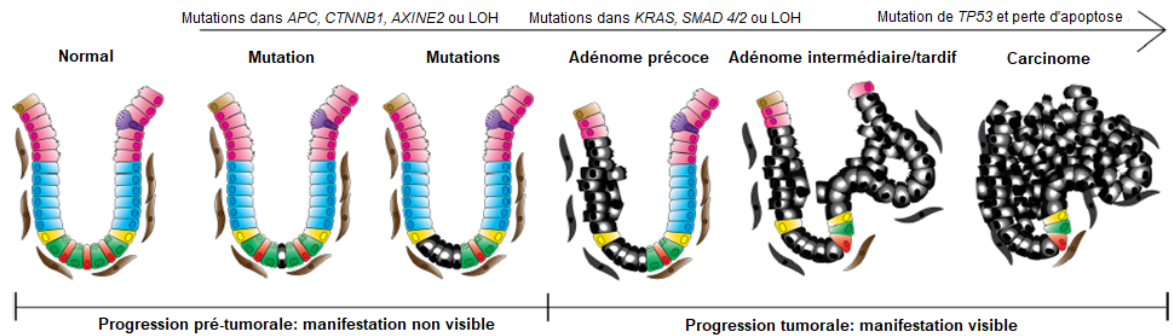


Figure 3. La séquence adénome-carcinome.

La formation du cancer colorectal suit une séquence adénome-carcinome bien définie par les mutations qui se succèdent, de la transformation d'un épithélium normal en adénome, puis vers la progression en carcinome. La première mutation à survenir affecte principalement le gène APC, mais peut aussi impliquer les gènes *CTNNB1* ou *AXIN2*. La formation de l'adénome précoce se fait suite à une mutation dans les gènes *KRAS* et *SMAD 4/2*. Finalement le développement du carcinome est caractérisé par la mutation du gène *TP53*. La perte des mécanismes d'apoptose est également impliquée. LOH = *loss of heterozygosity*. Traduit de Ma et al., 2016. Image libre d'accès.

3.2.3 Importance de la voie Wnt/ β -caténine

Les cellules souches sont depuis déjà quelques années soupçonnées d'être à l'origine du cancer colorectal (Barker et al., 2009; Zhu et al., 2009). En effet, les adénomes murins présentent une expansion des cellules souches, plus spécifiquement des cellules positives pour LGR5 (Schepers et al., 2012). Comme la voie Wnt/ β -caténine est essentielle au maintien et à la prolifération des cellules souches intestinales. (Kretschmar and Clevers,

2017; Sato et al., 2011), cela suggère fortement que la voie Wnt/ β -caténine est très importante pour l'initiation des adénomes colorectaux.

D'abord, l'activation aberrante de la signalisation β -caténine est responsable du développement de près de 90% de tous les cancers colorectaux. En effet, dans la vaste majorité des cas, c'est une mutation inactivatrice dans le gène suppresseur de tumeur *APC* qui est responsable et dans les autres cas, c'est une mutation activatrice dans le gène qui code pour la β -caténine, *CTNNB1* (Giles et al., 2003). Nos connaissances sur le développement du cancer colorectal ont beaucoup progressé grâce au modèle murin *Apc*^{Min/+}. En effet, l'allèle *Apc*^{Min} code pour une protéine tronquée de sa partie carboxy-terminale, qui ne peut alors ni se lier aux microtubules, ni participer à la dégradation de la β -caténine (Su et al., 1992). La protéine ainsi générée n'est donc pas fonctionnelle ni dans son rôle de régulateur de la voie Wnt/ β -caténine, ni dans son rôle de régulateur du fuseau mitotique durant la mitose, et donc du maintien de la stabilité du génome (Munemitsu et al., 1994; Smith et al., 1994). Ces souris développent donc de nombreux polypes ou adénomes, surtout dans l'intestin grêle mais aussi dans le côlon. C'est ce phénotype qui leur a valu le nom MIN (*Multiple Intestinal Neoplasia*) (Moser et al., 1995; Su et al., 1992). Les souris hétérozygotes pour *Apc*^{Min/+} présentent une instabilité chromosomique et certains événements génétiques surviennent menant à la perte de l'allèle sauvage de *Apc*, ce qui engendre la formation des polypes mentionnés plus tôt. Il s'agit là du phénomène de perte d'hétérozygotie ou LOH (*loss of heterozygosity*). Donc, à elle seule, l'absence des deux allèles de *Apc* engendre la formation de nombreux adénomes bénins, aussi appelés polypes, appuyant l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans l'initiation de la carcinogénèse colorectale.

De manière intéressante, la voie Wnt/ β -caténine n'est cependant pas seulement impliquée dans l'initiation de la carcinogénèse colorectale, mais aussi dans la progression des tumeurs. En effet, cette voie de signalisation régule aussi des processus nécessaires à l'invasion et la formation de métastases, notamment la migration cellulaire (Hankey et al., 2018). Plus précisément, la signalisation Wnt/ β -caténine est connue pour réguler l'expression de différents gènes cibles qui peuvent être impliqués dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses dont notamment des gènes codant pour des enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire telles que *MMP7* (*matrix metalloproteinase 7*) et

ADAM10, et des récepteurs d'adhésion tels que *L1-CAM* et *CD44* (*cluster of differentiation 44*) (Brabletz et al., 1999; Gavert et al., 2007; Wielenga et al., 1999). D'ailleurs, il a été montré qu'un variant de CD44, CD44v6, était exprimé dans les cellules souches cancéreuses, ce qui augmentait leurs capacités invasive et migratoire (Todaro et al., 2014). De plus, il a été mis en évidence que l'expression nucléaire de la β -caténine était modulée avec la progression tumorale. En effet, il a été montré que la β -caténine nucléaire était plus abondante dans les tumeurs indifférenciées et invasives que dans les tumeurs différenciées (Brabletz et al., 2001). De la même façon, une simple restauration de l'expression de la β -caténine est suffisante pour retrouver une morphologie épithéliale presque normale et ce, même en présence des mutations *TP53* et *KRAS* (Dow et al., 2015). Il a également été observé qu'une diminution de la signalisation β -caténine chez les souris *Apc*^{Min/+} par l'utilisation d'un antagoniste du complexe β -caténine/TCF4 avait un effet anti-tumoral (Fang et al., 2016; Jaeckel et al., 2018). Ainsi, plusieurs preuves appuient le fait que la signalisation Wnt/ β -caténine est essentielle non seulement pour l'initiation de la carcinogénèse colorectale, mais également pour sa progression des tumeurs.

SECTION 3.2 : LES MALADIES INFLAMMATOIRES INTESTINALES

3.2.1 Généralités

Il existe deux formes prédominantes de maladies inflammatoires intestinales (MII): la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. La colite ulcéreuse est normalement caractérisée par une inflammation superficielle du rectum qui s'étend vers le côlon, tandis que la maladie de Crohn est une inflammation transmurale qui affecte n'importe quelle région du tractus gastrointestinal, avec une prédominance dans l'iléon (Yu and Rodriguez, 2017; Zhang and Li, 2014). Ces deux types d'inflammation sont également distinguables par des aspects phénotypiques. Par exemple, dans la colite ulcéreuse, une réduction de la production de mucines est observée. À l'inverse, dans la maladie de Crohn, une augmentation de la production de mucus est notée (Dorofeyev et al., 2013). Aussi, chez les patients atteints de la maladie de Crohn, un durcissement des tissus dû à une fibrose est observé (Georges et al., 2007; Rieder et al., 2007). Tout de même, dans les deux cas, les patients atteints

d'inflammation intestinale vont souffrir des douleurs abdominales, de diarrhée et de saignements rectaux (Yu and Rodriguez, 2017).

3.2.2 Causes de la maladie

Les MII sont des maladies dont l'apparition et le développement sont influencés par une multitude de facteurs. De plus, bien qu'il y ait des prédispositions génétiques connues et que des facteurs environnementaux y soient fortement associés (diète, tabagisme, stress, géographie, etc.), la cause réelle des MII reste difficile à cerner (Zhang and Li, 2014).

Plusieurs gènes de prédisposition ont été identifiés dans des analyses génomiques à grande échelle. C'est entre autres le cas de *NOD2* (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing 2*), un récepteur intracellulaire qui reconnaît des sous-produits bactériens. Un variant de ce gène a été associé à la maladie de Crohn; la mutation retrouvée entraîne la formation d'une protéine tronquée qui active de façon aberrante la signalisation NF- κ B (*Nuclear factor kappa-B kinase*), et donc une réponse pro-inflammatoire exagérée (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Un autre gène identifié comme étant important dans le développement de l'inflammation intestinale est le gène *ATG16L1* (*autophagy related 16-like 1*). Celui-ci code pour ATG16L1, une protéine impliquée dans l'autophagie, un processus cellulaire par lequel les cellules dégradent des macromolécules et des organites cellulaires superflus. C'est également un processus cellulaire qui est impliqué dans la dégradation des pathogènes invasifs (bactéries et virus) modulant ainsi la résistance aux infections (Siqueira et al., 2018). Plusieurs études ont montré que des mutations dans le gène *ATG16L1* sont associées avec un risque élevé de développement de la maladie de Crohn (Hampe et al., 2007; Rioux et al., 2007). En fait, la mutation T300A de ce gène réduit considérablement l'activité autophagique ce qui affaiblit ainsi la défense cellulaire contre les bactéries. De manière intéressante, chez des souris *knock-in* pour le variant ATG16L1 T300A, la signalisation des TLRs (*Toll like receptors*) est augmentée de même que celle de l'IL-1 β (Lassen et al., 2014; Saitoh et al., 2008).

En 2009, une étude clinique réalisée chez des patients japonais a identifié deux polymorphismes dans le gène *PTPN11*, le gène codant pour SHP2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2*), une phosphatase très similaire à SHP1. Ces

polymorphismes ont été montrés comme étant fortement associés à une susceptibilité accrue à développer une colite ulcéreuse (Narumi 2009). L'équipe de la Pre Rivard a démontré que l'expression de SHP2 était fortement diminuée la muqueuse de patients souffrant de colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn. De plus, des souris *knockout* pour l'expression de SHP2 uniquement dans l'épithélium intestinal, développent spontanément une colite ulcéreuse un mois après leur naissance (Coulombe et al., 2013; Yamashita et al., 2014). Les analyses histologiques ont montré une baisse importante du nombre de cellules caliciformes avant l'apparition du phénotype inflammatoire, ainsi qu'une dysbiose (Coulombe et al., 2013, 2016), tel qu'observé chez les patients souffrant de colite (Hansen et al., 2010).

Les quelques études discutées plus haut indiquent que l'altération de gènes contrôlant différents processus cellulaires, peuvent mener au développement de l'inflammation ou à augmenter la susceptibilité à développer une MII. Hormis les facteurs génétiques, il existe également plusieurs facteurs environnementaux qui influencent le développement de ce type de pathologies. C'est notamment le cas du tabagisme reconnu pour être un des facteurs les plus importants. Effectivement, il a déjà été montré que les patients atteints de la maladie de Crohn qui fument ont un taux de rechutes de la maladie beaucoup plus important que les patients qui arrêtent de fumer ou qui n'ont jamais fumé (Nunes et al., 2016). En fait, il a été mis en évidence que le tabagisme pourrait nuire à l'autophagie dans les macrophages, ce qui pourrait expliquer son impact sur les MII (Monick et al., 2010). Un autre facteur important dans le développement des MII est la diète, particulièrement la diète riche en gras. En effet, la consommation de lipides saturés amène une accumulation et une activation des macrophages, ce qui augmente la libération de cytokines pro-inflammatoires (Weisberg et al., 2003). Ensemble, tous ces différents facteurs, environnementaux ou génétiques, viennent perturber l'homéostasie intestinale, menant à une réponse immunitaire exagérée et à l'inflammation.

4. La tyrosine phosphatase SHP1

SECTION 4.1 : GÉNÉRALITÉS

4.1.1 Similitudes et différences avec SHP2

SHP1, pour *Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1*, est, comme son nom l'indique, une tyrosine phosphatase. Cette phosphatase, avec SHP2, sont les deux seules tyrosine phosphatases non-transmembranaires à avoir deux domaines SH2 en tandem, en N-terminal. Ces deux phosphatases possèdent d'ailleurs 59% d'identité de séquence (Poole and Jones, 2005), ce qui leur confère donc une structure très similaire. En effet, comme la Fig. 4A le montre, ces deux phosphatases sont composées des trois régions principales : deux domaines SH2 en N-terminal, suivis du domaine catalytique phosphatase, puis d'une queue C-terminale. La queue C-terminale est la région la plus variable entre SHP1 et SHP2. En effet, chez SHP1, cette région comprend trois sites de phosphorylations régulateurs de son activité et un signal de localisation nucléaire (NLS). SHP2 possède les trois mêmes sites de phosphorylation, en plus d'en avoir un quatrième, mais la différence majeure vient de l'absence du NLS et de la présence d'une région riche en proline dans la queue C-terminale de SHP2 (Craggs and Kellie, 2001; Poole and Jones, 2005; Yang et al., 2002).

Malgré leur grande similitude, les phénotypes associés à la perte d'expression de SHP1 ou de SHP2 sont très distincts. En effet, un modèle génétique de délétion de SHP2 entraîne la mort *in utero* des souriceaux dû à des problèmes de développement (Saxton et al., 1997), tandis que les deux modèles murins ayant chacun une mutation de SHP1, soit les souris *Motheaten* (*me/me*) et *Motheaten viable* (*me^v/me^v*), vont mourir en raison d'une déficience immunitaire vers l'âge de 2-3 semaines ou 9-12 semaines respectivement (Green and Shultz, 1975). Il en est ainsi puisque ces deux phosphatases opèrent différemment. En effet, SHP2 est d'abord une protéine exprimée de manière ubiquitaire, tandis que SHP1 est très fortement exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique et également à de plus faibles niveaux dans les épithéliums (Feng et al., 1993; Lorenz, 2009; Yi et al., 1992). De plus, bien que SHP1 et SHP2 soient capables de réguler des molécules de signalisation similaires, notamment les kinases Src, JAK2 (*janus-associated kinase 2*) et le facteur de

transcription STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) (Li et al., 2015; Wu et al., 2003a; Zhang et al., 2009), ces deux phosphatases sont plus connues comme ayant des cibles et des effets distincts. Effectivement, SHP2 est connu comme étant un régulateur positif de voie de signalisation, notamment la voie ERK/MAPK (Agazie and Hayman, 2003; Montagner et al., 2005) par la déphosphorylation de régulateurs négatifs tels que Sprouty2 (Jarvis et al., 2006). Au contraire, SHP1 est mieux caractérisé comme étant un inhibiteur de signalisation, notamment dans la signalisation en aval des récepteurs des cellules B et T (BCR et TCR), de même que de la signalisation en aval des récepteurs de différents facteurs de croissance (EGF, CSF-1 (*colony stimulating factor 1*), insuline) (Chen et al., 1996; Dubois et al., 2006; Tenev et al., 1997).

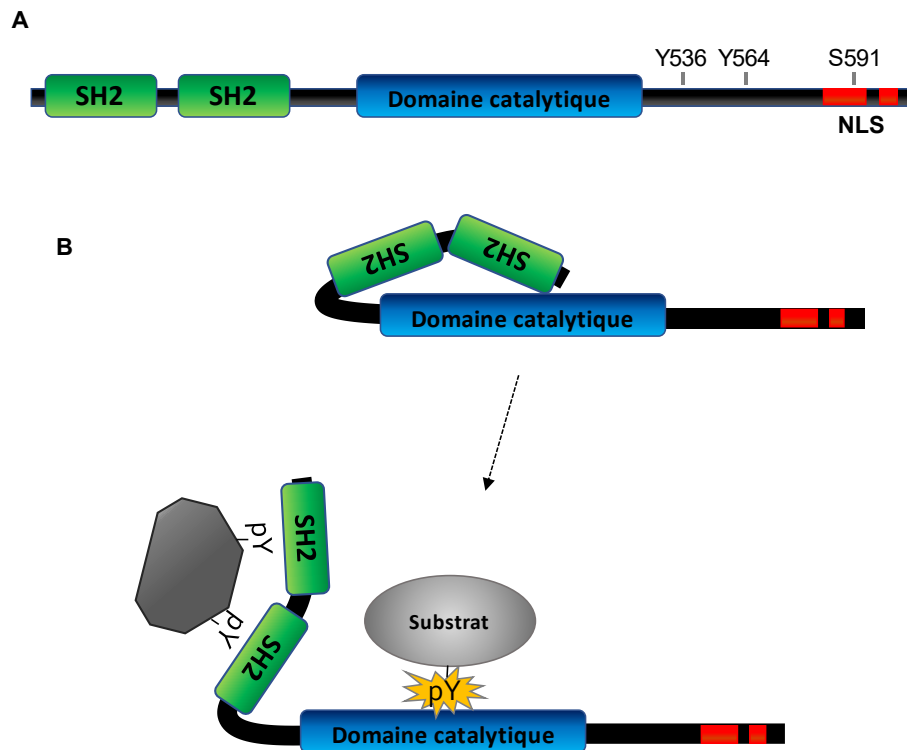


Figure 4. Structure de la tyrosine phosphatase SHP1.

A. SHP1 est composé de deux domaines SH2 en tandem en N-terminal, suivi d'un domaine catalytique phosphatase puis d'une queue C-terminale. Cette dernière région contient 3 sites de phosphorylation importants pour réguler son activité. De plus, un signal de localisation nucléaire (NLS) est situé à l'extrémité C-terminale. **B.** En condition basale, la protéine SHP1 est repliée sur elle-même où le domaine N-SH2 interagit avec le domaine phosphatase, ce qui rend la protéine inactive. Suivant l'engagement des domaines SH2, la protéine se déplie et le domaine phosphatase est libéré, activant la protéine.

4.1.2 Régulation

Bien que la régulation de SHP1 ne soit pas totalement comprise, il est connu que cette phosphatase puisse être régulée à plusieurs niveaux. D'abord, l'aspect principal de la régulation de SHP1 se fait sur son activité. En effet, à l'état basal, SHP1 présente une conformation refermée où son domaine SH2 le plus en N-terminal (le domaine N-SH2) vient obstruer le site catalytique du domaine phosphatase de SHP1 grâce à des liaisons intramoléculaires dont des ponts hydrogènes (Fig 4B) (Yang et al., 2003). Suivant l'engagement des domaines SH2 avec ses activateurs phosphorylés sur tyrosine, des changements de conformation libèrent le domaine catalytique phosphatase, laissant ainsi SHP1 pleinement active (Fig. 4B) (Wang et al., 2011; Yang et al., 2003).

Il existe également une régulation post-traductionnelle de SHP1 qui passe notamment par différentes phosphorylations. Plus précisément, les sites de phosphorylations ayant un rôle dans la régulation de SHP1 se situent tous dans la queue C-terminale. D'abord, il est connu que suivant l'activation de RTKs, SHP1 est phosphorylé sur les tyrosines 536 et 564 par des membres de la famille de Src (SKFs), ce qui permet d'augmenter son activité phosphatase (Zhang et al., 2003). En effet, lorsque la SKF LYN phosphoryle SHP1 sur sa tyrosine 536, l'activité phosphatase est augmentée. Par contre, une observation intéressante qui a été faite indique que suivant une phosphorylation de SHP1 par la SKF FYN, il y a inhibition de SHP1 due à une phosphorylation d'un autre site, soit la sérine 591 (Mkaddem et al., 2017). En effet, il a déjà été montré que la sérine 591 est une phosphorylation inhibitrice pouvant être effectuée par entre autres la protéine kinase C (PKC) (Jones et al., 2004; Liu et al., 2007). De plus, ce site de phosphorylation est situé dans le NLS de SHP1 et par conséquent, lorsque la sérine 591 est phosphorylée, la localisation nucléaire de SHP1 est compromise (Liu et al., 2007). Ainsi, non seulement la sérine 591 est régulatrice de l'activité de SHP1, mais en plus contribue à réguler sa localisation cellulaire.

Finalement, bien que ce soit peu étudié, un autre élément de régulation de SHP1 passe par sa transcription. Il faut d'abord savoir que le gène qui code pour SHP1 (*PTPN6*) possède deux promoteurs nommés P1 et P2. Pendant longtemps, il a été assumé que le promoteur P1 était seulement actif dans les cellules épithéliales, tandis que le promoteur P2 était actif dans les cellules d'origine hématopoïétique (Banville et al., 1995). La différence majeure dans les

transcrits et protéines générées à partir de ces promoteurs alternatifs se situe dans le 5'-UTR et dans les premiers acides aminés. En effet, le promoteur P1 génère une protéine qui commence par Met-Leu-Ser-Arg-Gly alors que la protéine issue du promoteur P2 débute par Met-Val-Arg. Autrement, le reste de la protéine est complètement identique (Banville et al., 1995; Tsui et al., 2002). Plus récemment, des études ont montré que l'activation de ces deux promoteurs n'était pas si exclusive à un type cellulaire, mais que les deux transcrits étaient retrouvés tant dans les cellules épithéliales que les cellules d'origine hématopoïétique (Evren et al., 2013; Tsui et al., 2002). De façon intéressante, plusieurs études ont montré que les promoteurs P1 et P2 pouvaient être activés par différents acteurs. Notamment, le promoteur P1 pourrait être activé par les facteurs de transcription NF- κ B et USF1/2 (*upstream stimulatory factors 1 and 2*) (Tsui et al., 2002) et le promoteur P2 par le facteur de transcription à domaine ETS PU.1 (Wlodarski et al., 2007) de même que par SP1, OCT-1, NF- κ B et CREB-1 (*CAMP responsive element binding protein 1*) (Nakase et al., 2009).

SECTION 4.2 : SHP1 : UN SUPPRESSEUR DE TUMEUR

4.2.1 Cellules d'origine hématopoïétique

SHP1 est très grandement étudiée dans les cellules d'origine hématopoïétique où elle est fortement exprimée (Yi et al., 1992). Étant un régulateur négatif de plusieurs voies de signalisation, la régulation de SHP1 est importante pour prévenir l'hyperactivation cellulaire et maintenir l'homéostasie. Par exemple, la perte de SHP1 permet la persistance de signaux de signalisation dont la signalisation JAK/STAT3 et la signalisation en aval de IL-2R, ce qui engendre la transformation oncogénique des cellules hématopoïétiques (Han et al., 2006a; Zhang et al., 2000b).

Il a été rapporté que le gène *PTPN6* codant pour SHP1 est hyperméthylé dans plusieurs types de leucémie et de lymphomes, ce qui corrèle avec une perte d'expression de la protéine SHP1 (Han et al., 2006a; Koyama et al., 2003; Li et al., 2014; Oka et al., 2002; Uhm et al., 2009; Zhang et al., 2000b). De plus, la méthylation aberrante du promoteur de *PTPN6* est considérée comme un signe de progression tumorale (Koyama et al., 2003; Li et al., 2014), et est associée à une augmentation de la résistance à certains traitements comme c'est le cas pour l'Imatinib utilisé pour traiter des patients atteints de leucémie myéloïde

chronique (Esposito et al., 2011). De façon intéressante, une étude a déjà montré que la méthylation du promoteur de SHP1 dans certains lymphomes serait dépendante de l'hyperactivation de STAT3 (Zhang et al., 2005). En fait, lorsqu'on force la réexpression de SHP1 dans des cellules tumorales issues de leucémies ou de lymphomes, leur croissance est inhibée et leur différenciation est même promue dans certains cas (Al-Jamal et al., 2015; Bruecher-Encke et al., 2001; Koyama et al., 2003). Ces résultats indiquent donc que la perte d'expression de SHP1 est un événement important pour le développement tumoral d'origine hématopoïétique.

4.2.2 Cancers du système digestif

SHP1 est également reconnue comme étant une protéine suppressive de tumeur dans des cancers affectant différents organes du système digestif. C'est notamment le cas du cancer du foie, un organe annexe au tube digestif. D'abord, dans les hépatocarcinomes, l'expression de SHP1 est significativement réduite dans les tumeurs en comparaison avec le tissu sain adjacent, en raison de l'hyperméthylation du promoteur de SHP1. De plus, la seule délétion de SHP1 dans les hépatocytes est suffisante pour induire à 11 mois la formation de tumeurs chez 100% des individus (Wen et al., 2018). Aussi, la réduction d'expression de SHP1 par siARN permet d'augmenter la croissance de lignées d'hépatocarcinome, tandis que la surexpression de SHP1 dans ces cellules altère leur prolifération et leur potentiel tumoral chez la souris nue (Fan et al., 2015a; Wen et al., 2018). De la même façon, l'utilisation d'activateurs pharmacologiques de SHP1, le Sorafenib et/ou le SC-43, permet de réduire la taille des tumeurs hépatiques chez les souris, et augmente leur survie (Chao et al., 2016).

SHP1 semble également impliqué dans le cancer gastrique, où encore une fois, son expression est diminuée dans les tissus cancéreux suivant une méthylation aberrante de son promoteur (Bernal et al., 2008; Joo et al., 2016; Ksiao et al., 2009). Une étude récente a d'ailleurs mis en lumière que la méthylation du promoteur de *PTPN6* dans le cancer gastrique pouvait être la conséquence d'une infection avec la bactérie *Helicobacter pylori* (Saju et al., 2016). Bien que ce soit moins bien caractérisé, le promoteur de SHP1 semble aussi être méthylé dans le cancer colorectal (Xiong et al., 2009). De façon intéressante, il a été montré que dans différentes lignées cellulaires épithéliales de carcinome gastrique et colorectal, la

réexpression ou l'activation de SHP1 réduit la prolifération cellulaire, de même que la migration et capacité d'invasion de ces cellules, en plus de diminuer la formation de métastases *in vivo*. Encore une fois, cet effet passerait par l'inhibition de la voie JAK2/STAT3, connue pour être directement régulée par SHP1 (Fan et al., 2016; Han et al., 2006b; Joo et al., 2016; Wu et al., 2003a). De plus, il existe une panoplie de composés proposés pour combattre les cancers gastriques et colorectaux en causant l'activation de SHP1, ce qui permet d'inhiber le niveau d'activation de la voie JAK/STAT3. Parmi ceux-ci figurent notamment le Regorafenib et ses dérivés, le SC-43 et le SC-78 (Chung et al., 2018; Fan et al., 2014, 2015b; Joo et al., 2015; Koh et al., 2018; Song et al., 2017; Zhang et al., 2018).

SECTION 4.3 : SHP1 ET INFLAMMATION

Il n'est pas étonnant que SHP1 soit impliqué dans le développement d'inflammation puisque cette phosphatase est fortement exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique, en plus d'être responsable de terminer la signalisation de plusieurs récepteurs à antigènes, à cytokines et à chimiokines dont le récepteur des cellules T et B (TCR et BCR), les récepteurs de mort (*Death receptor*), les récepteurs des interleukines-1, -4, etc. (Burshtyn et al., 2000; Croker et al., 2011; Cyster and Goodnow, 1995; Daigle et al., 2002; Fu et al., 2013; Kashiwada et al., 2001; Khalil et al., 2012; Kim et al., 1999).

4.3.1 Modèles *Motheaten* et *Motheaten viable*

Les premières évidences d'un rôle majeur pour SHP1 dans le développement d'inflammation proviennent de la découverte de modèles murins qui possèdent une mutation inactivatrice dans le gène *Ptpn6* (Tsui et al., 1993). Il y a d'abord les souris *Motheaten* qui ont une mutation dans le domaine N-SH2 générant une protéine tronquée sans aucune activité catalytique. Ces souris ont une espérance de vie d'environ 2-3 semaines. Ensuite, il y a les souris *Motheaten viable* qui, quant à elles, survivent jusqu'à 9-12 semaines puisque celles-ci présentent une mutation dans le site catalytique de SHP1, ce qui laisse une activité phosphatase résiduelle de 10-20% (Tsui et al., 2006). Ces deux modèles de souris vont tout de même arborer un phénotype similaire, soit un retard important de croissance et le

développement rapide d'une inflammation chronique et d'une auto-immunité. Plus précisément, ces souris vont souffrir de dermatite affectant tant la peau que les pattes, et de glomérulonéphrite. De plus, elles vont souffrir d'infections récurrentes et vont finalement développer une pneumonie hémorragique qui entraîne leur décès prématuré (Green and Shultz, 1975; Tsui et al., 2006). Des études plus poussées ont montré que les réactions auto-immunes et inflammatoires retrouvées dans ces deux modèles de souris sont dues à une suractivation des cellules d'origine hématopoïétique suivant la perte de SHP1 (Zhang et al., 2000a).

4.3.2 Contribution de SHP1 dans l'inflammation

Compte tenu du phénotype des souris *Motheaten*, SHP1 s'est rapidement placé comme étant un acteur crucial dans la régulation de la signalisation inflammatoire. Ainsi, afin de mieux comprendre la complexité de ce modèle murin, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à évaluer la contribution de SHP1 dans différents types cellulaires. D'abord, il est bien connu que SHP1 est recruté pour terminer la signalisation du BCR et du TCR lorsque ceux-ci sont activés (Cyster and Goodnow, 1995; Fu et al., 2013; Khalil et al., 2012). Plus précisément, la délétion de SHP1 seulement dans les cellules B a permis de montrer que ces cellules étaient responsables du développement de l'auto-immunité observée chez les souris *Motheaten*, mais en aucun cas de l'inflammation, puisque SHP1 régule le développement et la sélection des cellules B (Alsadeq et al., 2014; Pao et al., 2007). De la même façon, la perte de SHP1 dans les cellules dendritiques, impliquées dans l'immunité adaptative et dans la tolérance du soi, entraîne le développement de lymphadénopathie et de splénomégalie. En effet, les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes aux cellules T CD4⁺ naïves, ce qui entraîne la différenciation de ces dernières. Cependant, la délétion de SHP1 dans les cellules dendritiques entraîne une perte de détection du soi et ainsi, les souris développent des anticorps ciblant notamment les noyaux. La délétion de SHP1 dans les cellules dendritiques entraîne donc également un phénotype d'auto-immunité (Abram et al., 2013). Par contre, de façon étonnante, la délétion spécifique de SHP1 dans les thymocytes (cellules CD4⁺) restreint la survie de ceux-ci, empêchant ainsi d'avoir des cellules T fonctionnelles (Martinez et al., 2016). Enfin, le croisement de souris *Motheaten* avec des souris *Rag1*^{-/-} (*recombination activating gene 1*) ou *Prkdc*^{scid} (*protein kinase, DNA-*

activated, catalytic subunit/severe combined immunodeficiency) indique que même en absence de recombinaison VDJ, et donc en absence de lymphocytes actifs, le phénotype *Motheaten* est maintenu. Cette étude a donc validé que les cellules B et les cellules T ne contribuent pas au phénotype des souris *Motheaten*, outre l'apparition d'auto-immunité. (Dominique and Francis, 1995; Yu et al., 1996).

Ensuite, il a été observé que la délétion de SHP1 dans les neutrophiles engendre chez les souris une inflammation au niveau des pattes, en plus de présenter une légère infiltration de cellules immunitaires dans les poumons, ce qui mime une partie du phénotype des souris *Motheaten* (Abram et al., 2013). En fait, SHP1 a été montrée pour réguler l'apoptose des neutrophiles. Effectivement, une réduction de l'activité de SHP1 entraîne une augmentation de la survie de ce type de cellules (Yousefi and Simon, 2003). Et pour cause, SHP1 est capable de lier, chez les neutrophiles, les récepteurs de mort (*Death receptors*) dont Fas, suivant leur activation, ce qui permet de limiter la signalisation anti-apoptotique (Daigle et al., 2002). C'est donc sans surprise que les souris *Motheaten* ont une grande quantité de neutrophiles circulants, en plus d'en retrouver dans les poumons et les régions inflammées de la peau (Shultz et al., 1984). De plus, SHP1 est connu pour réguler la production d'IL-1 β par les neutrophiles, une cytokine pro-inflammatoire. Ainsi, dans les neutrophiles où SHP1 est absente, une boucle de contrôle positif est engendrée où l'IL-1 β stimule la production de pro-IL-1 β , ce qui vient alimenter le phénotype inflammatoire observé (Crocker et al., 2011).

Hormis les évidences pour un rôle crucial de SHP1 dans les cellules d'origine hématopoïétique, SHP1 semble également impliqué dans l'inflammation d'autres tissus. C'est notamment le cas des poumons où la régulation de la signalisation de l'IL-4 et IL-13 semble dépendre de SHP1, et qui semble impliqué dans le développement d'inflammation pulmonaire chez les souris *Motheaten* (Oh et al., 2009). Au niveau intestinal, SHP1 semble aussi important pour contrer l'apparition de maladies inflammatoires intestinales. En effet, récemment, une étude a mis en évidence une corrélation positive entre la présence de deux SNPs (*single-nucleotides polymorphisms*) dans le gène *PTPN6* et des patients atteints de la maladie de Crohn (Bouzid et al., 2013). De plus, il a aussi été montré que l'expression de SHP1 est significativement plus basse dans les tissus de patient atteints de colite ulcéreuse et de maladie de Crohn, en comparaison avec les tissus sains. SHP1 a donc été même

suggérée pour être un facteur de susceptibilité pour les maladies inflammatoires intestinales (Christophi et al., 2012).

Bref, bien que ces différentes études aient augmenté notre compréhension du rôle de SHP1 dans différents types cellulaires, aucune n'a permis de reconstituer le phénotype des souris *Motheaten* indiquant que ce phénotype est dû à une combinaison complexe d'effets accumulés de la baisse d'activation de SHP1 dans différents types cellulaires et organes.

SECTION 4.4 : SHP1 DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL

Peu de choses sont connues concernant le rôle de SHP1 dans l'intestin et encore moins sur son rôle dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Depuis quelques années, notre laboratoire s'y est intéressé et a mis en lumière quelques évidences qui suggèrent un rôle important pour SHP1 dans l'épithélium intestinal.

D'abord, il a été montré que la protéine SHP1 était bel et bien exprimée dans l'épithélium intestinal avec une expression majoritairement nucléaire. Ces observations ont été réalisées sur des coupes de jéjunum et de côlon foetal humain, dans différentes lignées cellulaires colorectales normales (IEC-6 et HIEC) ou cancéreuses (Caco-2/15) et dans le jéjunum murin adulte (Duchesne et al., 2003; Leblanc et al., 2017). De façon intéressante, il a été noté que l'expression de SHP1 était plus importante dans les cellules différenciées de la villosité, tant chez le fœtus humain que chez la souris adulte. En fait, par l'utilisation du modèle Caco-2/15, capable de se différencier après la confluence, il a été montré que l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation corrèle avec une augmentation significative de l'expression de SHP1 (Duchesne et al., 2003). Ainsi, ces résultats suggèrent que SHP1 pourrait être impliqué dans le contrôle négatif de la prolifération et/ou de la différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Le rôle de SHP1 sur la différenciation des CEIs a été évalué dans un modèle murin invalidé pour SHP1 spécifiquement dans l'épithélium intestinal (*Shp1*^{CEI-KO}) que j'ai généré pendant mes études de maîtrise. Les souris déficientes pour l'expression de SHP1 dans l'épithélium intestinal démontrent effectivement des altérations dans la différenciation des différents types cellulaires de l'épithélium. Notamment, il a été montré que la perte d'expression de SHP1 favorise l'expansion des cellules caliciformes et de Paneth, au

détriment des cellules entéroendocrines et des entérocytes absorbants. Cependant, les cellules de Paneth atteignent difficilement le niveau terminal de leur différenciation (Leblanc et al., 2017). Une autre observation intéressante a permis de mettre en lumière que l'expression de SHP1 est importante pour le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. En effet, les souris *Shp1*^{CEI-KO} présentent une intestinalomégalie caractérisée par une augmentation de la longueur et du poids de l'intestin grêle, en plus d'afficher une hypertrophie cellulaire et un épaississement de la musculature, sans toutefois présenter de fibrose (Leblanc et al., 2017). Ce phénotype a été associé à l'hyperactivation de la voie de signalisation PI3K/AKT/S6 qui est observée dans les cellules épithéliales intestinales isolées de la souris *Shp1*^{CEI-KO} (Leblanc, 2015; Leblanc et al., 2017) et qui ressemble au phénotype observé chez les souris *Pten*^{CEI-KO} (Langlois et al., 2009).

L'implication de SHP1 sur le contrôle de la prolifération a également été évaluée. Dans un premier temps, des études *in vivo* ont mis en lumière que la perte de SHP1 dans les cellules épithéliales intestinales augmente légèrement mais significativement le nombre de cellules prolifératives dans la crypte intestinale (Leblanc et al., 2017). Ces résultats sont en accord avec des résultats précédents obtenus dans une lignée épithéliale intestinale normale (HIEC) et qui ont montré que l'expression ectopique de SHP1 réduit l'expression de gènes cibles associés à la progression du cycle cellulaire, soient les gènes *DHFR* (dihydrofolate réductase), *MYC* (c-myc) et *CCND1* (cycline D1) (Duchesne et al., 2003). À noter que les gènes *MYC* et *CCND1* sont des gènes aussi connus pour être activés par le complexe β -caténine/TCF4 (He et al., 1998; Tetsu and McCormick, 1999). L'impact de SHP1 sur l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 a ainsi été questionnée. Par essai luciférase, en utilisant le gène rapporteur TOPFLASH, il a été montré que la surexpression de SHP1 réduit l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 et que cet effet est dépendant de son activité phosphatase (Duchesne et al., 2003). De façon intéressante, il a été montré que SHP1 n'interfère pas avec la liaison de ce complexe à l'ADN. Par contre, SHP1 lie la β -caténine directement et la déphosphoryle sur ses résidus tyrosines 86 et 654, des résidus qui étaient connus pour être importants pour son activité transcriptionnelle (Duchesne et al., 2003; Simoneau et al., 2011). En effet, l'expression de mutants non-phosphorylables de la β -caténine réduit l'activité transcriptionnelle du complexe

β -caténine/TCF4. De plus, il a été montré que chez les souris *Motheaten* et chez les souris *Shp1^{CEI-KO}* que la perte d'expression de SHP1 entraîne une augmentation de l'expression protéique de la β -caténine dans l'épithélium intestinal (Leblanc, 2015; Simoneau et al., 2011). Aussi, *in cellulo*, la surexpression de SHP1 diminue la stabilité de la β -caténine (Simoneau et al., 2011). En bref, ces différentes études ont permis de suggérer pour la première fois que la phosphatase SHP1 était probablement un régulateur négatif de la β -caténine dans les cellules épithéliales intestinales.

5. Hypothèse et objectifs

SHP1 est une tyrosine phosphatase connue comme étant un régulateur négatif de plusieurs voies de signalisation, dont JAK/STAT3, PI3K/AKT, de même que la signalisation en aval du BCR, du TCR et de nombreux récepteurs à cytokines et chimiokines (Croker et al., 2011; Cyster and Goodnow, 1995; Han et al., 2006b; Kashiwada et al., 2001; Khalil et al., 2012; Kim et al., 1999; Leblanc et al., 2017; Wu et al., 2003a). Notamment, cette phosphatase est connue pour réguler la prolifération et l'activation de cellules d'origine hématopoïétique, où elle est fortement exprimée et largement étudiée (Lorenz, 2009; Yi et al., 1992). Bien que SHP1 soit exprimée dans différents épithéliums, dont l'épithélium intestinal, son rôle y reste moins bien défini, bien que quelques études réalisées par notre laboratoire ont déjà montré que SHP1 régularisait *in vitro* le niveau d'expression de la β -caténine et également le maintien de l'homéostasie générale de l'intestin *in vivo* (Duchesne et al., 2003; Leblanc, 2015; Simoneau et al., 2011).

L'objectif principal de mes travaux de recherche de doctorat était donc de mieux caractériser les mécanismes d'action moléculaires de SHP1 dans le contrôle de l'homéostasie épithéliale intestinale. Mon hypothèse de recherche était qu'en contrôlant négativement le niveau d'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et Wnt/ β -caténine, SHP1 module des processus cellulaires cruciaux pour le maintien de l'homéostasie tels que la synthèse protéique et l'activité des cellules souches. Par conséquent, SHP1 est aussi impliqué dans le développement de pathologies intestinales telles que le cancer colorectal et l'inflammation intestinale.

Mon premier objectif pour répondre à cette hypothèse était de vérifier le rôle de SHP1 sur le contrôle de la synthèse protéique et sur l'activité des cellules souches intestinales.

Mon second objectif visait à déterminer l'impact de la perte de SHP1 sur le développement et la progression du cancer colorectal, mais aussi sur le développement de l'inflammation intestinale.

Mon dernier objectif visait à mieux comprendre la régulation de l'expression de la phosphatase SHP1 dans les cellules épithéliales intestinales.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

1.1 ANTICORPS

Les anticorps contre SHP1 (C-19), Mek (N-20), Lamine B (M-20), la pompe Na⁺/K⁺ (H-300), ribosomal protein S6 (C-8), ERK (C-14) et SHP2 (C-18) viennent de chez Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, É.-U.). Les anticorps contre β -actine (clone 4) et α -puromycine (clone 12D10) ont été achetés chez EMD Millipore (Etobicoke, ON, Canada). Les anticorps contre eEF2 (2332), contre phospho-eEF2 T57 (2331), phospho-rpS6 S235/236 (2211), β -caténine active (8814), phospho-GSK3 β (9323), OLFM4 (D6Y5A), c-CBL (8447) et phospho- β -caténine S552 (9566) proviennent de chez Cell Signaling (Denver, MA, É.-U.) L'anti- β -caténine (610154) a été acheté chez BD Transduction Laboratories (Mississauga, ON, Canada). L'anticorps reconnaissant le lysozyme (A0099) provient de chez DAKO (Copenhagen, Danemark). L'anticorps ciblant Ki67 (clone SP6) a été acheté chez GeneTex (Irvine, CA, É.-U.) et l'anticorps ciblant la phosphorylation sur la sérine 591 de SHP1 (SP1531) vient de chez ECM Biosciences (Versailles, KY, É.U.). L'anti-HA a généreusement été fourni par le laboratoire du Pr François-Michel Boisvert. Les anticorps secondaires de souris (NA934V) ou de lapin (Na931V) couplés à la HRP proviennent de chez GE Healthcare Life Sciences (Pittsburg, MA, USA). Les anticorps secondaires de souris (S3721) ou de lapin (S3731) couplés à la phosphatase alcaline ont été achetés chez Promega (Madison, Wisconsin, É.-U.). Les anticorps secondaires d'âne AlexaFluor488 (anti-lapin) (A21206) ou AlexaFluor568 (anti-souris) (A10037) proviennent de Molecular Probes (Life Technologies, Burlington, ON, Canada).

2. Méthodes

2.1 GÉNÉRATION DES SOURIS EXPÉRIMENTALES

2.1.1 Modèles murins

Les souris *Ptpn6*^{loxP-loxP} (n°008336) disponibles chez Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, É.-U.) ont été fournies par le Pr Pedro Miguel Geraldès, du département de Médecine, service d'endocrinologie, de l'Université de Sherbrooke. Les souris *Villine-Cre*, quant à elles, ont été fournies par la Pre Nathalie Perreault, du département de Biologie cellulaire, de l'Université de Sherbrooke. Cependant, ces souris proviennent de la Dre Deborah Gumucio, du Department of Cell and Developmental Biology, de l'Université du Michigan. Les souris *Apc*^{Min/+} proviennent également du laboratoire de la Pre Nathalie Perreault, mais sont tout de même disponibles chez Jackson Laboratory (n°002020). Toutes ces souris sont maintenues avec un fond génétique de C57BL/6 pur et sont hébergées à l'Unité de Souris Transgénique du Pavillon de Recherche Appliquée au Cancer (PRAC) de la Faculté de Médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke. Les conditions d'hébergement sont standardisées et toutes les souris ont accès *ad libitum* à de la nourriture et à de l'eau fraîche. Chaque expérience est réalisée avec l'accord du Conseil Facultaire de Protection des Animaux (CFPA), en accord avec les directives du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

2.1.2 Croisements

Pour générer des souris invalidées pour SHP1 dans les CEIs, deux croisements sont nécessaires. D'abord, les souris *Ptpn6*^{loxP-loxP} sont croisées avec les souris *Villine-Cre* afin de générer les souris d'accouplement nécessaires au deuxième croisement (*Ptpn6*^{loxP/+}; Cre+). À leur tour, les souris *Ptpn6*^{loxP/+}; Cre+ sont croisées avec des souris *Ptpn6*^{loxP-loxP}, ce qui permet d'obtenir nos souris expérimentales *Ptpn6*^{loxP/loxP}; Cre+ qui, seront appelées *Shp1*^{CEI-KO}. Les souris dites contrôles sont issues des mêmes croisements que les souris expérimentales et portent soit le génotype *Ptpn6*^{loxP/+}, soit *Ptpn6*^{loxP/loxP}. Dans le cas des souris *Apc*^{Min/+}, la génération des souris *Apc*^{Min/+} invalidées pour SHP1 dans les CEIs passe par 3 croisements. Dans un premier temps, les souris *Apc*^{Min/+} sont croisées avec les souris *Villine-Cre* pour

obtenir des souris $Apc^{Min/+};Villin-Cre$. Ensuite, ces souris sont croisées avec des souris $Ptpn6^{loxP-loxP}$ pour générer des souris $Apc^{Min/+};Ptpn6^{loxP/+};Villin-Cre$. Enfin, ces souris $Apc^{Min/+};Ptpn6^{loxP/+};Villin-Cre$ sont à nouveau croisées avec des souris $Ptpn6^{loxP/loxP}$ pour obtenir des souris expérimentales $Apc^{Min/+};Ptpn6^{loxP/loxP};Villin-Cre$. Pour des fins de simplification, ces souris expérimentales sont appelées $Shp1^{CEI-KO};Apc^{Min/+}$. Les souris contrôles utilisées dans ce cas-ci portent soit le génotype $Apc^{Min/+};Ptpn6^{loxP/+}$ ou $Apc^{Min/+};Ptpn6^{loxP/loxP}$, et sont issus des mêmes croisements. Il est à noter qu'en tout temps, les souris *Villine-Cre* sont maintenu hémizygotes, et les souris $Apc^{Min/+}$ hétérozygotes pour leurs gènes respectifs, c'est-à-dire que tous les croisements sont conçus pour générer des souris qui n'ont qu'un seul allèle de ces gènes.

2.1.3 Génotypages

Le génotypage de chaque souris est effectué à partir d'un bout d'orteil prélevé entre 4 et 8 jours de vie des souriceaux. Le tissu est mis dans 100 μ L de 25 mM NaOH / 0,2 mM EDTA et chauffé à 95°C pendant 1 h. Ensuite, 100 μ L de 40 mM Tris-HCl pH 5.5 est ajouté et les échantillons d'ADN ainsi obtenus sont conservés à 4°C. Une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Bio-Rad, Hercules, CA, É.-U.) est ensuite effectuée avec les amorces listées dans le Tableau 1, et les produits de PCR obtenus sont observés sur gel d'agarose révélé au RedSafe (Bio-Rad) à l'aide d'un appareil Infinity VX2 1100/26MX Imaging system (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) équipé d'une lampe UV.

Tableau 1 : Amorces de génotypages de souris

Gène	Amorces	Amplicon
$Shp1^{loxP}$	5'- ACC CTC CAG CTC CTC TTC -3' 5'- TGA GGT CCC GGT GAA ACC -3'	Mut ~550pb Wt ~377pb
<i>Villine-Cre</i>	5'-TGC CAC GAC CAA GTG ACA GCA ATG-3' 5'-ACC AGA GAC GGA AAT CCA TCG CTC-3'	~340pb
$Apc^{Min/+}$	5' GCC ATC CCT TCA CGT TAG 3' 5' TTC CAC TTT GGC ATA AGG C 3' 5' TTC TGA GAA AGA CAG AAG TTA 3'	Mut~340pb Wt~600pb

Mut : allèle muté Wt : allèle sauvage

2.2 EUTHANASIE DES ANIMAUX

Les souris ont été euthanasiées selon les normes du CCPA, soit par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine/xylazine (87 mg de kétamine/13 mg de xylazine par kg) suivi d'une dislocation cervicale. Rapidement, les tissus sont prélevés et déposés sur glace, le temps de récolter les extraits nécessaires. Les extraits d'enrichissements de muqueuse ou d'enrichissement de cryptes sont rapidement déposés dans leur tampon de lyse, puis mis dans l'azote liquide. Les échantillons sont par la suite conservés à -80°C. Les tissus prélevés pour des analyses d'histologie sont fixés dans une solution de 4% paraformaldéhyde (PFA) pendant 18 h, puis conservés dans de l'EtOH 70% à 4°C.

Les enrichissements de muqueuses sont effectués par grattage à l'aide d'une lamelle afin de récolter un maximum d'épithélium, tandis que pour les enrichissements de cryptes, un premier grattage en surface est réalisé pour retirer un maximum de villosités, pour ensuite gratter ce qui reste, soit majoritairement des cryptes.

2.3 CULTURE DE CELLULES

Les HCT116 (ATCC® CCL-247) et les HT29 (ATCC® HTB-38) ont été achetées de chez ATCC (Manassas, VA, É.-U.). Ces deux lignées sont issues respectivement d'un carcinome et d'un adénocarcinome de côlon humain. Ces cellules sont cultivées dans du McCoy's 5A (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplémenté avec 5% FBS (« *Fetal bovine serum* », Wisent), 10 mM HEPES (Wisent), 2 mM de glutamine (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 50 unités/ml de pénicilline (Wisent), et 50 µg/ml de streptomycine (Wisent).

Les 293T (ATCC® CRL-11268), issues de rein embryonnaire, sont cultivées dans du DMEM (Wisent) contenant 5% de FBS (Wisent), 10 mM HEPES (Wisent), 2 mM de glutamine (Invitrogen), 50 unités/ml de pénicilline (Wisent), et 50 µg/ml de streptomycine (Wisent).

Les HCT116 Flp-In T-Rex ont été généreusement fournies par le laboratoire de François-Michel Boisvert. Ces cellules sont cultivées dans du DMEM (Wisent) contenant 5% de FBS (Wisent), 10 mM HEPES (Wisent), 2 mM de glutamine (Invitrogen), 50 unités/ml de pénicilline (Wisent), et 50 µg/ml de streptomycine (Wisent). Ces cellules

sont maintenues avec une sélection de blasticidine (5 µg/mL) et zéocine (100 µg/mL). Suivant une recombinaison grâce au système Flp-In, la sélection devient blasticidine et hygromycine (100 mg/mL).

Toutes les cellules sont cultivées à 37°C avec 5% CO₂. Pour évaluer la signalisation dans les populations de HCT1116 et de HT29 shSHP1, les cellules à 70% de confluence ont été privées en sérum pendant 18 h, puis stimulées au sérum 15 min avant d'être lysées.

L'aire relative des cellules a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (logiciel gratuit à code source ouvert). Les données sont calculées en pixels à partir des images obtenues par microscopie en contraste de phase.

2.4 LENTIVIRUS SHSHP1

2.4.1 Génération de shARN et production lentivirale

Le vecteur pLentiV6-U6 a été généré tel que décrit précédemment (Garneau et al., 2009). La séquence de shARN contre SHP1 et son contrôle ont été générées par l'outil « BLOCK-ITTM RNAi Designer » de Invitrogen.

Pour générer les lentivirus, des cellules 293T ont été utilisées. Ces cellules sont ensemencées de sorte à obtenir une confluence de 50% dans un pétri de 100 mm le lendemain, moment où les cellules sont transfectées. En bref, 6 µg du plasmide pLentiV6-U6 contenant soit le shARN ciblant SHP1, soit le shARN « scrambled » contrôle, et 6 µg de chacun des 3 vecteurs contenant les gènes des protéines d'encapsidation (p1p1, p1p2 et p1p3) sont mélangés avec 500 µL de *JetPrime Buffer* et 20 µL de *JetPrime reagent*. Tous les réactifs sont fournis avec le kit JetPrime[®] (114-07, Polyplus transfection, Illkirch-Graffenstaden, France). Le mélange est incubé pendant 10 min avant d'être doucement ajouté dans le milieu de culture des cellules et incubé pendant 48 h. Au terme des 48 h, les virus formés se retrouvent dans le milieu de culture. Celui-ci est donc prélevé puis filtré avec un filtre 0,45 µm. Les virus sont conservés en aliquots de 1 mL à -80°C.

2.4.2 Infection lentivirale

Les cellules HCT116 et HT29 sontensemencées afin d'obtenir une confluence d'environ 50% en pétri de 100 mm le lendemain, moment où les cellules sont infectées. À ce moment, le milieu des cellules est retiré et remplacé par 1 mL de virus avec 4 µg/mL de polybrène. Le tout est incubé à 37°C pendant 1 h, puis 6 mL de milieu est ajouté, et le tout est incubé pendant 48 h. Au terme de ces 48 h, les cellules sont passées et la sélection à la blasticidine (5 µg/mL) est ajoutée. Les populations de cellules obtenues sont par la suite cultivées en maintenant la sélection à la blasticidine.

2.5 EXTRACTION PROTÉIQUE

2.5.1 Souris

Les échantillons sont resuspendus dans du tampon RIPA froid avant d'être congelés. Ce tampon est constitué de 50 mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% Na déoxycholate DA, 0,1% SDS, 1 mM DTT, 40 mM β-glycérophosphate, en plus d'inhibiteurs de phosphatases (orthovanadate) et de protéases (PMSF, leupeptine, aprotinine et pepstatine). Pour aider à la solubilisation des tissus, les échantillons sont broyés mécaniquement par une bille d'acier inoxydable mise dans chaque tube, puis agitée dans un Tissue Lyser à 50 oscillations/seconde (Qiagen, Hilden, Allemagne). Les échantillons sont ensuite mélangés doucement à 4°C pendant 15 min, puis centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 min. Seul le surnageant est conservé, puis dosé selon la méthode BCA (Smith et al., 1985).

2.5.2 Cellules

Les cellules sont lysées à même leur pétri où le tampon de lyse Laemmli est déposé. Ce tampon est composé de glycérol 10%, SDS 2%, et Tris-HCl 63 mM, pH 6.8. Les cellules sont grattées du pétri dans le tampon de lyse puis le lysat est transféré dans un tube conique et chauffé à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont par la suite soniqués pendant 10 sec avec une intensité de 30% (Fisherbrand™ Q500 Sonicator, Thermo Fisher Scientific, NH, É.-U.). Les échantillons sont ensuite dosés de la même façon que les échantillons de souris.

2.6 IMMUNOBUVARDAGE

20 µg des protéines dosées sont mis dans du tampon Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2,3% SDS, 10% glycérol, 1 mM PMSF, 0.005% bleu de bromophénol et 5% β-mercaptoéthanol) puis chauffés à 95°C pendant 5 min. Les échantillons sont ensuite migrés sur un gel SDS-PAGE, puis transférés sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (IPVH00010, EMD Millipore). Les protéines transférées sont visualisées par une coloration de la membrane au Ponceau S (3504, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Les membranes sont ensuite bloquées dans une solution de lait en poudre 5% diluée dans du PBS 1X, 0,05% Tween pendant 30 min, puis incubées pendant 18 h avec l'anticorps primaire, dilué dans la solution de blocage. Les membranes sont ensuite lavées pendant 3 X 10 min avec du PBS 1X, 0,05% Tween avant d'être incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire, lui aussi dilué dans l'agent bloquant. Trois lavages de 10 min sont faits avant de révéler les immunobuvardages. Les anticorps couplés à la « *Horse Radish-Peroxydase* » (HRP) sont révélés avec une solution maison composée de 20 mL de Tris-HCl pH8.5 avec 100 µL de luminol 250 mM (123072), 50 µL d'acide coumarique 90 mM (C9008) et 6 µL de peroxyde d'hydrogène 30% (Thermo Fisher Scientific). Les anticorps couplés à la phosphatase alcaline sont révélés avec une solution de CDP Star (T2305, Life Technologies, Carlsbad, CA, É.-U.) dilué à 1 :200 dans du tampon 1 M Tris, 1 M NaCl, pH 9.5. Toutes les membranes ont été exposées avec des films autoradiographiques (Denville Scientific Inc., Saint-Laurent, QC, Canada).

2.7 EXTRACTION D'ARN ET RT-PCR

2.7.1 Extraction d'ARN

Les échantillons sont resuspendus dans du tampon RLT de Qiagen supplémenté de 10 µL/mL de β-mercaptoéthanol. S'il s'agit d'échantillons de souris, les lysats sont homogénéisés de la même façon que les extraits de protéines, soit avec le Tissue Lyser de Qiagen, sinon les lysats de cellules sont passés 10 fois à travers une seringue munie d'une aiguille de 20G. L'extraction des ARN se fait avec le RNeasy Mini Kit de Qiagen (74104). Un traitement à la DNase de Qiagen est utilisé tel que décrit dans le protocole du kit RNeasy.

2.7.2 RT-PCR

1 µg d'ARN purifié est mis dans un volume final de 10 µL avec 1 µL de *Random Primers*, 0,4 µL de 25 mM dNTP, 2 µL de 5X *Random Primer Buffer*, 0,25 µL de *RNAse inhibitor* et 0,25 µL de *Reverse Transcriptase* (RT), le tout du kit *Random Primers* de Invitrogen (48190011). Le tout est alors incubé pendant 10 min à 25°C, puis 30 min à 55°C pour finalement être rapidement transféré à 85°C pour 5 min avant d'être remis sur glace. Les ADN ainsi obtenus sont par la suite envoyés à la plateforme de RNomique de la Faculté de Médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke pour faire l'analyse de gènes par qPCR.

2.8 CIRCULATION ET INCLUSION DES TISSUS

Les tissus de souris fixés et conservés à 4°C dans de l'EtOH 70% sont envoyés à la plateforme d'histologie et de microscopie électronique de la FMSS pour être circulés et inclus dans de la paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont faites puis déposées sur des lames Probe-On Plus (Thermo Fisher Scientific, Canada). Les colorations à l'hématoxyline et éosine ont toutes été réalisées par cette plateforme.

2.9 COLORATION ALCIAN BLEU

Les lames de coupes histologiques sont d'abord chauffées à 60°C pendant au moins 15 min, puis immergées dans du xylène 100% pendant 2 x 5 min pour déparaffiner les lames. Les tissus sont ensuite hydratés par une série de bains : 2 x 2 min dans 100% EtOH, 1 min dans 95% EtOH, 1 min dans 80% EtOH, 1 min dans 70% EtOH puis 1 min dans de l'eau pure. Les tissus sont ensuite fixés à l'acide acétique aqueuse 3% à pH 2.5, puis les lames sont incubées pendant 30 min avec l'Alcian Bleu 1% dans acide acétique 3% à pH 2.5. Les lames sont ensuite lavées à l'eau courante pendant 10 min puis contre-colorées au Nuclear Fast Red filtré 0,1 % (Kernechtrot) durant 40 s, avant d'être rincées à nouveau sous l'eau courante pendant 1 min. Les tissus sont ensuite déshydratés par une autre série de bains : 2 min dans l'EtOH 70%, 2 x 2 min dans l'EtOH 95%, 2 x 2 min dans l'EtOH 100% et finalement 5 min dans le xylène 100%. À ce moment, les lames sont montées avec une

lamelle a microscopie et du Vectashield (H1500, Vector Laboratories, CA, É.-U.). L'Alcian Bleu permet de visualiser les mucines acides et donc les cellules caliciformes. Toutes les photos de coupes histologiques ont été prises avec un Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu, Photonics, NJ, É.-U.).

2.10 IMMUNOFLUORESCENCE

Les tissus sont chauffés et hydratés de la même façon que celle décrite à la section 2.9. Les lames sont ensuite immergées dans une solution de 10 mM acide citrique monohydrate pH 6.0 et bouillies pendant au moins 6 min au four à micro-ondes. Après avoir tempéré pendant 10 min, toujours dans le tampon citrate, les lames sont rincées doucement à l'eau courante pendant 10 min. Les tissus sont bloqués avec du PBS 1X, 2% BSA pendant 30 min et l'anticorps primaire, dilué dans l'agent bloquant, est ensuite incubé pendant 18 h. Suivant 3 lavages au PBS 1X, l'anticorps secondaire, lui aussi dilué dans du PBS 1X, 2% BSA, est incubé à la température de la pièce pendant 2h, caché de la lumière. Pendant les 3 lavages de 5 min au PBS 1X, une étape d'incubation de 15 min d'Hoechst est effectuée. Après que les tissus soient bien lavés, les lames sont rapidement rincées à l'eau distillée puis montées avec de l'Immu-Mount (9990402, Thermo Fisher Scientific). Les photos ont été prises à l'aide d'un module de fluorescence installé sur un Nanozoomer 2.0 RS.

2.11 IMMUNOHISTOCHIMIE

Les tissus sont chauffés et hydratés tel que décrit à la section 2.9. Les lames sont ensuite immergées dans une solution de 10 mM acide citrique monohydrate pH 6.0 ou 10 mM Tris Base, 1 μ M EDTA, 0,05% Tween 20, pH 9.0 pour l'immunohistochimie contre β -caténine. Encore une fois, les lames sont bouillies pendant au moins 6 min au four à micro-ondes. Après avoir tempéré pendant 10 min dans leur tampon citrate ou Tween-EDTA, les lames sont rincées doucement à l'eau courante pendant 10 min puis les tissus sont incubés 5 min avec une solution de « *Peroxydase block* » (Dako). Après un lavage de 5 min au PBS 1X, les tissus sont bloqués avec du PBS 1X, 2% BSA pendant 30 min, à la température ambiante. L'anticorps dilué dans l'agent bloquant est ensuite incubé sur les tissus à 4°C pendant 18 h, avant d'être lavés 3 X 5 min au PBS 1X. Ensuite, les tissus sont incubés 1 h à

température ambiante avec du « *anti-rabbit labelled polymer HRP* » (Dako), puis lavés à nouveau 3 X 5 min avec du PBS 1X. La révélation se fait avec une solution de 1 mL de DAB+ « *Substrate buffer* » avec une goutte de « *DAB+ chromogen* » (Dako). Lorsque la révélation est suffisamment forte, la réaction est arrêtée par immersion des lames dans de l'eau déionisée. Une contre-coloration des tissus est faite avec de l'hématoxyline de Gills pendant 5 s, avant de rincer les tissus à l'eau à faible débit pendant 2 min. Les lames sont par la suite immergées dans une solution d'alcool acide (95% EtOH, 0,1N HCl) pendant 30 s puis lavées à nouveau pendant 2 min. Un dernier contraste est effectué en immergeant les lames cette fois-ci dans une solution de Blueing (2 mL d'hydroxyde d'ammonium dans 1 L d'eau, pH10.0) pendant 1 min. Finalement, les tissus sont déshydratés tel que décrit à la fin de la section 2.9. Tous les produits identifiés Dako proviennent du kit EnVision Detection System HRP/DAB (K4011). Les lames ont été scannées à l'aide d'un Nanozoomer 2.0 RS.

2.12 TRAITEMENT DSS

2.12.1 Traitements

Des souris mâles et femelles de 12 sem ont été traitées avec du Dextran Sulfate de Sodium (DSS) (36-50KDa, colitis grade, MP Biomedical, Ohio, CA, É.-U.) dilué à 1,75% ou 2,25% dans l'eau de boisson pendant 7 jours consécutifs. Pour les traitements aigus, les souris sont euthanasiées suivant le 7^e jour de traitement au DSS à 2,25%. Pour le traitement suivi d'une période de récupération, les souris sont abreuvées de DSS 1,175% pendant les 7 premiers jours, puis avec de l'eau pour les 14 jours suivants. Dans tous les cas, le DSS est changé à mi-traitement, soit le 4^e jour. De plus, le poids des souris est mesuré quotidiennement et la présence de signes d'inflammation tel que la présence de diarrhée ou de saignements est notée.

2.12.2 Index de maladie et score histologique

Au terme des traitements, les animaux sont euthanasiés tel que décrit à la section 2.2. Au moment de l'euthanasie, l'index de la maladie est évalué en considérant 4 critères, chacun échelonné de 0 à 4, à partir de l'index de maladie établie par Cooper *et al.* en 1993. Ainsi, un score de 0 correspond à un animal totalement sain et un score maximal de 16 peut être

obtenu chez un animal très hautement affecté. Les 4 critères sont : la présence de sang dans les selles, la présence de saignement rectaux, la consistance des fèces et la dureté du côlon. Par la suite, le score histologique indique la sévérité des dommages à la muqueuse évaluée à partir des coupes histologiques obtenues. Les critères pris en compte sont l'étendue des dommages, la présence d'infiltration de cellules immunitaires, l'épaississement de la musculature, la présence d'abcès de crypte et finalement la réduction du nombre de cellules caliciformes. Cette échelle, créée à partir des critères établis par Erben *et al.* en 2014, va de 0, soit un animal complètement sain, à 11, un animal avec des dommages sévères.

2.13 ÉVALUATION DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE PAR SUNSET

Des souris âgées de 6 sem ont reçu une injection intra-péritonéale de 10 mM de puromycine à raison de 4 μ L/g de souris. Trente min suivant l'injection, les souris ont été euthanasiées tel que décrit à la section 2.2. Pour les cellules, des HCT116 et des HT29 à 80% de confluence ont été traitées avec 10 μ M de puromycine pendant 1 h, puis les cellules ont été lysées. La détection des peptides liés à la puromycine se fait par immunobuvardage.

2.14 FRACTIONNEMENT CYTO-NOYAU

Les extraits d'enrichissement de cryptes ont été solubilisés dans du tampon de lyse composé de 743 μ L d'eau distillée stérile, 200 μ L de tampon 5X (50 mM HEPES pH 7.9, 5 mM EDTA, 300 mM KCl), 5 μ L de NP-40, 1 μ L de 1 M DTT, 6 μ L de 0,25 M PMSF, 200 μ M orthovanadate, 0,5 μ g/mL leupeptine, 0,7 μ g/mL pepstatine et 0,5 μ g/mL aprotinine. Les échantillons ont été triturés à l'aide d'un cône de p1000 puis d'un cône de p200 afin d'homogénéiser les tissus, sans endommager les cellules. Suivant une incubation de 5 min sur glace, les échantillons ont ensuite été centrifugés à 13 000 rpm pendant 20 s à 4°C. Le surnageant a été prélevé et constitue la fraction cytosolique. Le culot est quant à lui resuspendu dans environ 200 μ L de *Nuclear resuspension buffer* (743 μ L d'eau, 250 μ L de NFB 4X (1 M Tris pH 7.8, 300 mM KCl), 1 μ L de 1 M DTT, 6 μ L de 0,25 M PMSF, 200 μ M orthovanadate, 0,5 μ g/mL leupeptine, 0,7 μ g/mL pepstatine et 0,5 μ g/mL aprotinine. Les échantillons de noyaux sont ensuite soumis à 3 cycles d'incubations de 2 min dans de l'azote liquide, suivi de 2 min à 37°C. Entre chacun de ces cycles, les échantillons sont vigoureusement vortexés, puis soniqués tel que décrit à la section 2.5.2. Les échantillons sont

ensuite centrifugés pendant 10 min à 13 000 rpm à 4°C. Le surnageant est prélevé et constitue la fraction nucléaire des échantillons.

2.15 CULTURE D'ORGANOÏDES

Lors de l'euthanasie des souris, le jéjunum est prélevé et ouvert sur sa longueur, puis rincé avec du PBS 1X stérile. Les villosités sont doucement grattées à l'aide d'une lamelle de verre. Le jéjunum est par la suite coupé en petits morceaux d'environ 5mm de longueur qui sont transférés dans un tube conique de 50 mL contenant du PBS 1X. Les morceaux y sont agités, et le PBS 1X est fréquemment changé afin de bien laver les bouts de tissus. Le PBS 1X est ensuite changé pour 20 mL de PBS 1X, 30 mM EDTA, dans lequel les tissus sont incubés 5 min sur glace, puis agité doucement. La solution de PBS 1X, 30 mM EDTA est ensuite changée et les tissus sont incubés sur glace pendant 20 min. La solution d'EDTA est retirée par la suite et remplacée par 40 mL de PBS 1X. Les tissus sont ensuite vigoureusement agités pendant au moins 6 min, ou jusqu'à ce qu'une bonne quantité de cryptes se retrouve dans la solution (visualiser fréquemment au microscope). Un tamis cellulaire de 70 µm est utilisé pour filtrer la solution, permettant de récolter les cryptes, mais pas les villosités ni les morceaux de tissus bruts. Les cryptes sont ensuite centrifugées à 150 g pendant 5 min à 4°C. Le culot est lavé avec du milieu Ad-DF+++ (500 mL de Advanced-DMEM/F12 (Life technologies, 12634-010), 5 mL de Glutamax, 5 mL de HEPES et 5 mL de Pen/Strep. Le tout est à nouveau centrifugé à 150 g pendant 5 min. Le culot est ensuite repris dans 1 mL de Matrigel (BD Corning, 356231). Le mélange de cryptes/Matrigel est ensuite déposé en goutte de 25 µL au fond des puits d'une plaque de 48 puits. La plaque est ensuite incubée pendant au moins 30 min à 37°C pour faire figer le Matrigel, puis 250 µL de milieu ENR chaud est ajouté à chaque puits. Le milieu est changé aux 3-4 jours, et les organoïdes sont passés environ aux 7 jours.

Le milieu ENR est composé de 16 mL de Ad-DF++, 50 µL de 500 mM n-Acétylcystéine (Sigma, A9165), 20 µL de 50 µg/mL EGF (Life technologies, PMG8045), 400 µL de B27 supplement (Gibco/Thermo Fisher, 17504-044), 200 µL de N2 supplement (Gibco, 17502-048), 2 mL de milieu conditionné Noggin (10% final) et 2 mL de milieu conditionné R-Spondin1 (10% final). Les milieux conditionnés Noggin et R-Spondin1 sont

produits par des lignées stables de HEK293T qui expriment Noggin-Fc et R-Spondin1-Fc et qui nous ont été généreusement données par le Dr. G. R. van den Brink (Hubrecht Institute, Utrecht, Pays-Bas) et par le Dr. C. Kuo (Stanford University, Stanford, CA, É.-U.) respectivement. Les photos en contraste de phase d'organoïdes ont été prises à l'aide d'un Zeiss Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

L'aire relative des organoïdes a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (logiciel gratuit à code source ouvert). Les données sont calculées en pixels à partir des images obtenues par microscopie en contrastes de phase.

2.16 INCORPORATION D'EDU

2.16.1 Cellules

Deux jours suivant leur ensemencement, les HCT116 et les HT29, à environ 70% de confluence, sont incubées avec 10 μ M de EdU pendant 1 h à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées avec 4% PFA pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS 1X, 3% BSA, puis perméabilisées avec une solution de PBS 1X, 0,5% Triton X-100 pendant 20 min. Un nouveau lavage de PBS 1X, 3% BSA est effectué, puis les cellules sont bloquées avec du PBS 1X, 2% BSA pendant 30 min, toujours à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 min, à l'abri de la lumière, avec le *Click-iT® reaction cocktail* composé de 430 μ L de 1X *Click-iT® reaction buffer*, 20 μ L de CuSO_4 , 1,2 μ L de Alexa Fluor® 555 azide et 50 μ L de *Reaction buffer additive*, pour un total de 500 μ L. Toutes les solutions sont fournies et préparées à partir des indications fournies dans le Click-iT EdU imaging kit (C10338, Invitrogen). Le réactif est ensuite retiré et les cellules sont lavées avec du PBS 1X, 3% BSA, puis avec du PBS 1X. Pour colorer l'ADN dans les noyaux, les cellules sont ensuite incubées avec 5 μ g/mL de Hoechst 33342 fourni dans le kit, pendant 30 min, à l'abri de la lumière, puis lavé 3 fois avec du PBS 1X. La détection de la fluorescence s'est faite à l'aide d'un microscope Leica DFC300X (Leica, Buffalo Grove, IL, É.-U.).

Les décomptes du nombre de cellules EdU positives sur cellules ont été calculé à l'aide du logiciel Cell Profiler 2.2.0 (logiciel gratuit à code source ouvert). Les valeurs sont

exprimées en pourcentage du nombre de cellules EdU positives sur le nombre de cellules totales, déterminé par une coloration au Hoechst.

1.16.2 Organoïdes

Lors du passage d'organoïdes, les organoïdes sont ensemencés sur Nunc Lab-Tek Chamber Slide™ (C7182; Sigma-Aldrich) puis suivant 5 jours de culture, les organoïdes sont incubés pendant 1 h avec 20 µM d'EdU. Le reste de la procédure est identique à celui décrit ci-haut pour les cellules. La détection de la fluorescence s'est faite avec un microscope confocal LSM Olympus FV1000.

2.17 CROISSANCE EN INDÉPENDANCE D'ANCRAGE

Le test de croissance en indépendance d'ancrage est réalisé sur des populations de cellules HCT116 et de HT29 sous-exprimant un shARN contrôle (shSCR) ou un shARN dirigé contre SHP1 (shSHP1) de manière stable. Le fond des puits de plaques 6 puits ont été recouverts de 1 mL d'un mélange 1:1 de milieu/agarose. Le milieu utilisé pour les HCT116 et les HT29 est du McCoy's 2X (10% FBS, 20 mM HEPES, 4 mM de glutamine, 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine). L'agarose (A9045, Sigma) est resuspendu dans du PBS 1X à 1,4% et autoclavé. Le tout est maintenu à ~42°C afin de maintenir le mélange liquide. Les cellules (15 000 cellules pour les HCT116 et 50 000 cellules pour les HT29) sont ensuite mélangées dans le mélange 1:1 milieu/agarose et 2 mL est déposé sur les fonds au préalable préparés et maintenant figés. Les plaques de 6 puits sont ainsi laissées sous la hotte de culture pour permettre à l'agarose de solidifier, puis 1 mL de milieu de culture 1X est ajouté à la surface. Le tout est ensuite mis à 37°C, 5% CO₂. Le milieu est changé aux 2 jours, et après 10 jours (HCT116) ou 14 jours (HT29), les colonies formées sont colorées avec 0,5 mg/mL de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) pendant 3 h à 37°C. Les photos des colonies colorées ont été prises avec un appareil Infinity VX2 1100/26MX Imaging system (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) et le dénombrement des colonies a été fait par le logiciel ImageJ 1.45s software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, É.-U.).

2.18 STABILITÉ DE SHP1

Des cellules 293T ont été ensemencées en pétri de 100 mm de sorte à obtenir une confluence de 60% le lendemain. À ce moment, les cellules sont transfectées avec 10 µg de vecteur pCDNA3.1+ exprimant ou pas la β -caténine-Flag dans 500 µL de *JetPrime Buffer* et 20 µL de *JetPrime reagent*. Le lendemain, les cellules transfectées sont passées en plaque de 12 puits. Vingt-quatre heures après, le milieu des cellules est changé, en ajoutant 30 mg/mL de cycloheximide (CHX), puis les cellules sont lysées aux temps 0, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h et 24 h.

2.19 DÉTERMINATION DE L'UBIQUITINATION DE SHP1

2.19.1 Culture cellulaire

Les cellules 293T ensemencées en pétri de 100 mm ont été transfectées le lendemain au *Jet Prime*, à 60% de confluence, avec 5 µg de vecteur exprimant l'ubiquitine étiquetée HA (Ub-HA) et 5 µg de vecteur exprimant SHP1 étiqueté FLAG (SHP1-Flag) ou β -caténine étiquetée FLAG (β -caténine-Flag). Le lendemain de la transfection, le milieu des cellules a été changé, et 48 h suivant la transfection, les cellules ont été lysées avec du tampon Triton (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8, 40 mM β -glycérophosphate, 50 mM NaF, 5% glycérol, 5% fluorure phénylméthylsulfonyl (PMSF), 200 µM orthovanadate, 0,5 µg/mL leupeptine, 0,7 µg/mL pepstatine et 0,5 µg/mL aprotinine).

2.19.2 Immunoprécipitation contre SHP1

Les lysats sont agités à 4°C pendant 15 min, puis centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant a été conservé et les protéines dosées par la méthode BCA. Huit cents µg de protéines ont été mis dans un volume total de 1 mL de tampon Triton avec 15 µL de billes G-sepharose (17061801, GE Healthcare) et agités à 4°C pendant 1 h. Pendant ce temps, 30 µL de billes G-sepharose sont agitées dans 1 mL de tampon Triton avec 2 µg d'anticorps anti-SHP1, pendant 1 h, à 4°C. Les 15 µL de billes sont ensuite retirés du lysat de cellules en centrifugeant 30 s à 6 000 rpm, et les billes couplées à l'anticorps sont lavées 3 fois au tampon Triton. Le lysat est alors incubé pendant 2 h à 4°C avec agitation avec les

30 µL de billes maintenant liées à l'anticorps. Suivant cette incubation, les billes sont lavées 3 fois avec du tampon Triton, puis resuspendues dans 40 µL de Laemmli bleu 2X (131 mM Tris-HCl pH 6.8, 4,6% SDS, 20% glycérol, 2 mM PMSF, 0.01% bleu de bromophénol et 10% β-mercaptoéthanol), puis chauffées 5 min à 95°C. Les billes sont ensuite retirées et 10 µL sont déposés sur gel SDS-PAGE pour valider l'immunoprécipitation par immunobuvardage. Le 30 µL restant est déposé sur gel SDS-PAGE pour détecter par immunobuvardage l'ubiquitination (détection de l'étiquette HA).

2.20 UTILISATION DE siARN

Les trois siARN ciblant c-CBL (siCBL A, siCBL B et siCBL C) (SR300613A – B – C, OriGene Technologies, Rockville, MD, É.-U.) et le siContrôle (SR30004, OriGene Technologies) ont été utilisés à 40 nM. Les cellules 293T ont été transfectées à 60% de confluence avec un des siARN ciblant CBL ou le siARN contrôle avec du *JetPrime* tel que décrit plus haut. Le lendemain matin, le milieu de culture a été changé, et les cellules ont été lysées à 48 h de transfection.

2.21 SPECTROMÉTRIE DE MASSE

2.21.1 Clonage du vecteur pGLAP1-TurboID-SHP1

Le système Gateway® (Life technologies) a été utilisé pour la génération des plasmides. Les amorces suivantes ont été utilisées : 5' - GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TTC-GCC-ACC-ATG-GTG-AGG-TGG-TTT-CAC-CGA-G – 3' et 5' - GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTG-CTT-CCT-CTT-GAG-GGA-ACC-CTT-GCT-C – 3'. Ces amorces permettent d'amplifier le gène codant pour SHP1 à partir de n'importe quel plasmide et d'insérer des séquences attB1 et attB2 de part et d'autre du gène. Ainsi, SHP1 peut être inséré directement, et dans le bon cadre de lecture, dans n'importe quel vecteur du système Gateway®. À noter que les amorces utilisées amplifient à partir du codon d'initiation ATG, jusqu'au dernier codon avant le codon STOP puisque ce codon d'arrêt est intégré dans le plasmide de destination, et sa présence empêcherait l'ajout de protéine de fusion en C-terminal.

Le PCR d'amplification a été réalisé à l'aide du kit Q5® High-Fidelity DNA Polymerase de NEB (M0491S, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, É.-U.) selon les recommandations de la compagnie. Le produit de PCR a été isolé et purifié par migration sur gel d'agarose 1%. Le produit obtenu a été inséré dans le vecteur pDONR 221 par réaction de BP Clonase (11789020, Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fabricant. Le produit obtenu a été transformé dans des bactéries thermo-compétentes DH10β et étalé sur des plaques kanamycine. Les clones obtenus ont été validés par séquençage. Une réaction de LR clonase (11791020, Thermo Fisher Scientific) a ensuite permis de transférer le gène de SHP1 du vecteur donneur pDONR 221 vers le vecteur receveur pGLAP1 modifié de sorte à permettre l'expression de la biotine ligase TurboID en N-terminal de SHP1. Le produit de réaction est ensuite transformé et déposé sur des plaques ampicilline. Les clones obtenus sont validés par séquençage.

2.21.2 Génération des cellules TurboID-SHP1

Les cellules sontensemencées en pétri de 60 mm, et le lendemain elles sont transfectées au JetPrime avec 4,5 µg de vecteur pOG44, contenant la Flp recombinase, et 0,5 µg de vecteur pGLAP1-TurboID-SHP1. Le lendemain, les cellules sont passées 1:1 en pétri de 100 mm et 24 h après, la sélection avec la blasticidine et l'hygromycine débute.

2.21.3 Induction de l'expression de TurboID-SHP1 et précipitation « *pull down* » Streptavidine

Les cellules sélectionnées sontensemencées à haute densité dans 4 pétris de 100mm. Le lendemain, 5 µg/mL de doxycycline est ajouté au milieu de culture pour induire pendant 24 h l'expression de la protéine de fusion TurboID SHP1. Six heures plus tard, les cellules sont privées en FBS pendant 18 h. La doxycycline a été ajoutée également au milieu dans FBS afin d'induire correctement l'expression de TurboID SHP1. Suivant cela, les cellules sont stimulées par l'ajout de milieu contenant du FBS pendant 30 min. Au même moment, 500 µM de Biotine est également ajoutée, aussi pour 30 min. Suivant cela, les cellules sont lysées avec 540 µL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 8 M urée, 1 mM DTT, inhibiteurs de protéases), puis 120 µL de 20% Triton X-100 est ajouté au lysat. Les échantillons sont ensuite mélangés par trituration, puis soniqués 3 X 10 s. 2,52 mL de tampon

de lyse est ensuite ajouté puis le tout est soniqué à nouveau, mais seulement une fois pendant 10 s. L'échantillon est ensuite séparé en trois aliquots égaux, puis centrifugés 10 min à 16 500 g à 4°C. Pendant ce temps, 100 µL de billes Streptavidine Sepharose High Performance (17-5113-01, GE Healthcare) sont ajoutés à 1 mL de tampon de lyse à température ambiante afin de les équilibrer. Le tampon est ensuite retiré par centrifugation à 1 000 g pendant 2 min. Le surnageant des échantillons est par la suite ajouté aux billes équilibrées et incubé pendant 18 h à 4°C, avec agitation. Au terme de cette incubation, les billes sont culotées par centrifugation de 5 min à 1 000 g. Les billes sont ensuite lavées 4 fois avec 1 mL de *Wash Buffer* (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 8 M urée) et agitées pendant 8 min. À la suite du dernier lavage, les billes sont resuspendues à 1 mL de *Wash Buffer* d'où 100 µL (soit 10% de l'échantillon) est prélevé pour valider l'expérience par immunobuvardage. Au 900 µL restant, les billes sont centrifugées à 1 000 g pendant 2 min, resuspendues dans 500 µL de 1 mM Biotine, 50 mM bicarbonate d'ammonium, puis lavées 5 fois avec 20 mM bicarbonate d'ammonium avant d'être rapidement congelées à sec dans l'azote liquide.

2.21.4 Préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse

Les billes congelées sont resuspendues dans du 10 mM DTT, 20 mM bicarbonate d'ammonium et incubées à 60°C pendant 30 min. Après avoir refroidi, un volume égal de 15 mM iodoacétamine, 20 mM bicarbonate d'ammonium est ajouté à la solution de DTT/billes, bien mélangé puis incubé 1 h à la température ambiante, à l'abri de la lumière. Ensuite, 1 M DTT est ajouté pour augmenter la concentration à 15 mM, puis incubé pendant 10 min, puis 50 ng de trypsine Gold (V5280, Promega) sont ajoutés. Le tout est incubé à 37°C pendant 18 h. Pour arrêter la digestion, de l'acide formique est ajouté pour arriver à une concentration finale de 1%. Le surnageant est alors prélevé et mis dans un tube Lo-Bind (0030122356, Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Les billes sont resuspendues dans une solution de 60% acétonitrile, 0,1% acide formique et incubées pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est prélevé et mis avec le surnageant précédent. Les échantillons ainsi obtenus sont ensuite asséchés à l'aide d'un SpeedVac (5305000304, Eppendorf), puis resuspendus dans 30 µL de 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) avant d'être nettoyés par ZipTip® (C5737, Millipore). Le cône de p10 ZipTip® est d'abord humidifié en aspirant 3 X 10 µL d'acétonitrile. Ensuite, le ZipTip® est équilibré en aspirant 3 X 10 µL de solution

0,1% TFA. L'échantillon est alors aspiré à travers le ZipTip® à coup de 10 µL, où l'échantillon est passé de 7 à 10 fois sur le cône. Le ZipTip® est ensuite lavé avec 3 X 10 µL de 0,1% TFA puis les peptides sont élués avec 3 X 10 µL de 1% acide formique, 50% acétonitrile. Chaque échantillon ainsi obtenu est ensuite séché par SpeedVac puis resuspendu dans 25 µL de 1% acide formique. À ce moment, les échantillons sont remis à la plateforme de protéomique de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke.

2.21.5 Analyse des données obtenues par spectrométrie de masse

Les données ont d'abord été analysées par le logiciel en ligne SAINT afin de déterminer la significativité des cibles obtenues. Ensuite, les cibles ayant obtenu un score SAINT supérieur à 0,7 ont été considérées comme étant des interacteurs de SHP1. Les 101 cibles ainsi obtenues ont par la suite été analysées grâce à un autre logiciel en ligne, Metascape (Zhou et al., 2019), afin d'identifier les processus cellulaires dans lesquels les cibles identifiées sont impliquées.

2.2 ANALYSES STATISTIQUES

Tous les graphiques et les analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7 (Irvine, CA, É.-U.). La normalité a été évaluée selon Shapiro-Wilk (AnaStats, France). La significativité a été déterminée par un Two-way ANOVA lorsque plusieurs données sont issues d'un même individu, ou sinon par un « Student *t* test » paramétrique si les données suivent une loi normale. Autrement, le « Student *t* test » non-paramétrique a été utilisé. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$ et * $p \leq 0.05$. Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

III. RÉSULTATS

Des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire suggéraient l'implication de la tyrosine phosphatase SHP1 dans la régulation de la prolifération *in cellulo* et dans le maintien de l'homéostasie générale de l'épithélium intestinal chez la souris (Duchesne et al., 2003; Leblanc et al., 2017; Simoneau et al., 2011). Mes travaux de recherche de thèse ont poursuivi dans cette direction en s'intéressant davantage aux mécanismes d'action de SHP1 dans la régulation de la fonction des cellules épithéliales intestinales.

Chapitre 1 : SHP1 dans le maintien de l'homéostasie intestinale

SECTION 1.1 : SHP1 CONTRÔLE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Afin de mieux comprendre les effets préalablement observés chez la souris, nous avons généré un modèle de cellules en culture qui sous-expriment SHP1 à plus de 90%. Des lentivirus codants soit pour un shARN dirigé contre SHP1 ou soit un shARN contrôle dirigé vers une séquence « *scrambled* » ont donc été générés. Des cellules cancéreuses colorectales humaines HCT116 et HT29 ont été infectées avec ces lentivirus, puis sélectionnées, permettant ainsi la génération de populations stables de cellules contrôles (shSCR) ou sous-exprimant SHP1 (shSHP1). La figure 5A montre l'efficacité du shARN ciblant SHP1 dans les deux lignées de cellules cancéreuses colorectales, de même que l'absence d'effet du shARN contrôle sur l'expression de SHP1 en comparaison avec une population de cellules non-infectées (NI).

L'observation des populations de cellules HCT116 et HT29 ainsi générées a rapidement permis de mettre en lumière une différence morphologique suivant la sous-expression de SHP1. En effet, tant dans les HCT116 que dans les HT29, les populations non-infectées (NI) et infectées avec un shARN contrôle (shSCR) montrent une morphologie très similaire (Fig. 5B, panneaux du haut et du centre). Cependant, les cellules sous-exprimant SHP1 (shSHP1) sont plus grosses (Fig. 5B, panneaux du bas). En effet, lorsque l'aire relative des cellules est mesurée, nous observons une augmentation significative de celle-ci dans les populations sous-exprimant SHP1 en comparaison aux cellules contrôles (Fig.5C). De façon

intéressante, dans l'épithélium intestinal murin déficient pour SHP1, c'est également ce qui est observé : l'absence d'expression de SHP1 engendre une hypertrophie des cellules épithéliales (Leblanc, 2015; Leblanc et al., 2017).

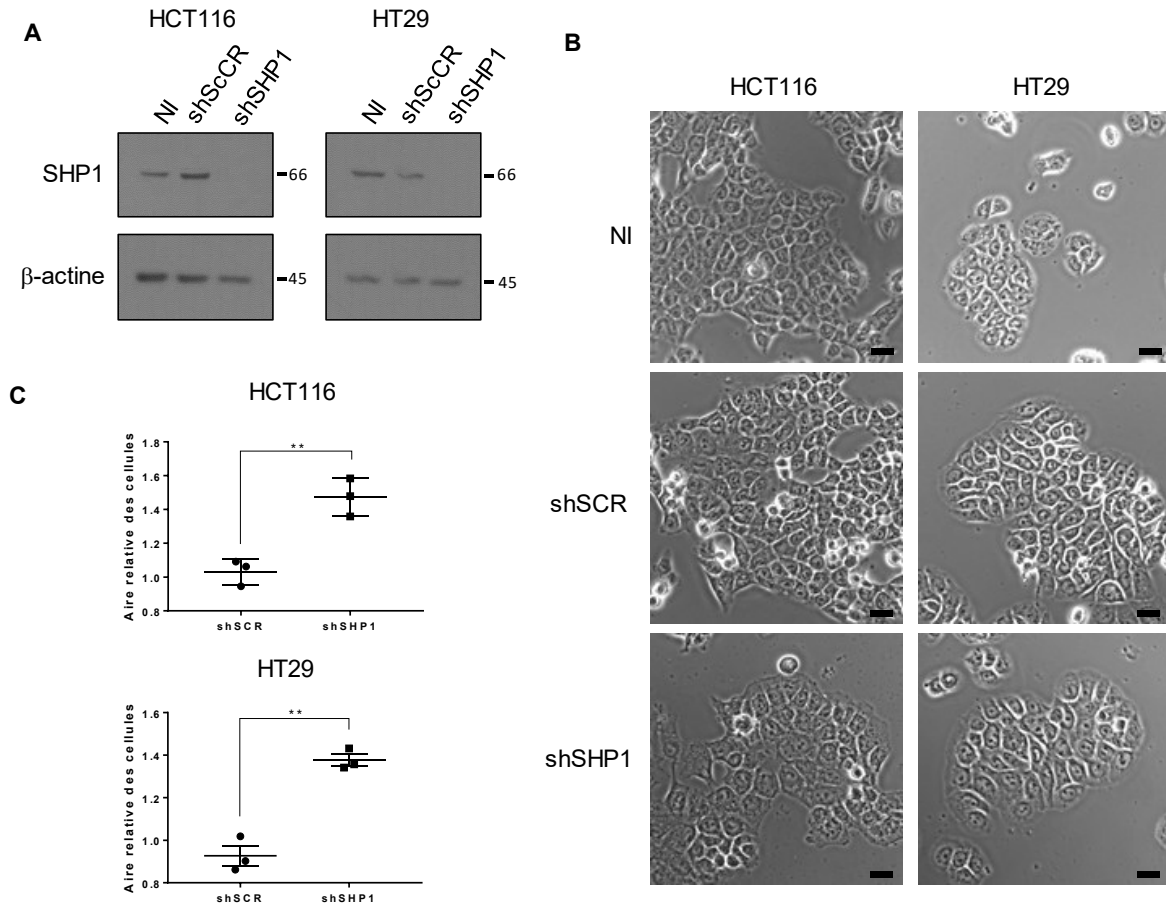


Figure 5. La sous-expression de SHP1 affecte la croissance cellulaire.

Les cellules HCT116 et HT29 ont été infectées avec un lentivirus codant pour un shARN dirigé contre SHP1 (shSHP1) ou un shARN contrôle d'une séquence « scrambled » (shSCR). **A.** Immunobuvardage contre SHP1 permettant de valider les populations de cellules shSCR et shSHP1. L'actine a servi de contrôle de charge. **B.** Photos en contraste de phase représentatives des populations de cellules HCT116 et HT29 contrôles et shSHP1. Barre de calibration = 20 μ m. **C.** Aire relative des cellules HCT116 et HT29 sous-exprimant ou non SHP1 (n=3, **p \leq 0,01). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

Afin de mieux comprendre par quels mécanismes SHP1 pouvait modifier la morphologie des cellules cancéreuses colorectales, nous avons voulu déterminer des partenaires d'interaction de SHP1 afin d'identifier des processus cellulaires dans lesquels

cette phosphatase est impliquée. Pour ce faire, nous avons opté pour une approche de « *Proximity labeling* » utilisant la biotine ligase TurboID couplée à SHP1. Cette protéine de fusion a ensuite été exprimée dans des HCT116 FlpIn T-rex et ce, de façon inducible. La biotinylation a été effectuée seulement pendant 30 min, suivant 24 h d'expression de la protéine SHP1. Les peptides biotinylés ont ensuite été évalués par spectrométrie de masse, et les cibles trouvées ont été analysées avec le logiciel SAINT. Ensuite, toutes les cibles qui ont obtenu un score SAINT supérieur à 0,7 (101 cibles identifiées) ont été analysées par le logiciel Metascape (Zhou et al., 2019). Ce logiciel a permis de regrouper les interacteurs trouvés pour SHP1 selon les fonctions qui leur sont attribuées. Ainsi, les données obtenues indiquent que SHP1 serait impliqué à plusieurs niveaux dans la régulation des ARNm. Effectivement, parmi les 10 processus cellulaires regroupant le plus de partenaires d'interaction de SHP1, plusieurs sont relatifs au traitement de l'ARNm. De plus, SHP1 serait aussi impliquée dans la biogénèse de complexes ribonucléoprotéiques (Fig. 6). Ensemble, ces données nous ont suggérés que SHP1 pourrait être présent dans l'environnement des ribosomes en considérant que ce sont des complexes ribonucléoprotéiques et qu'évidemment les ARNm y sont pris en charge. Ainsi, nous nous sommes intéressés à étudier la traduction, d'autant plus que les changements de taille cellulaire sont souvent associés à une modulation de la synthèse protéique (Cai et al., 2016; Damas et al., 2016). Nous avons alors spéculé que potentiellement SHP1 pouvait interférer avec ce processus cellulaire. Nous avons déjà démontré que l'épithélium des souris *Shp1*^{CEI-KO}, comparativement à celui des souris contrôles, présentait une forte phosphorylation de la protéine ribosomale S6 et d'AKT (Leblanc et al., 2017). RpS6 est bien connue pour son rôle dans le contrôle de la taille cellulaire, corrélant avec une hausse de la synthèse protéique (Ruvinsky et al., 2005). Dans un premier temps, nous avons vérifié si nos modèles de HCT116 et HT29 sous-exprimant SHP1 présentaient également une modulation de la phosphorylation de rpS6. Nous avons donc stimulé nos populations de cellules contrôles et shSHP1 avec du FBS pendant 15 min, suivant une privation en sérum de 18 h. Par immunobuvardage, nous avons pu observer que dans ces conditions, il y avait bel et bien une augmentation de 1,8X et de 1,3X de la phosphorylation des sérines 235 et 236, faites par la S6K, lorsque SHP1 est sous-exprimé chez les HCT116 et les HT29 respectivement (Fig. 7A). Nous avons également évalué la phosphorylation du facteur d'élongation eEF2, lui aussi régulé indirectement par la S6K via

eEF2K, et impliqué dans la synthèse protéique (Browne and Proud, 2004; Deng et al., 2017). Toujours dans les mêmes conditions de stimulation au sérum pendant 15 min suivant une privation de 18 h, nous avons noté une réduction de 68% et de 50% de la phosphorylation de eEF2 sur sa thréonine 56, connue pour réprimer ce facteur d'élongation de la traduction, chez respectivement les HCT116 et les HT29 (Fig. 7B).

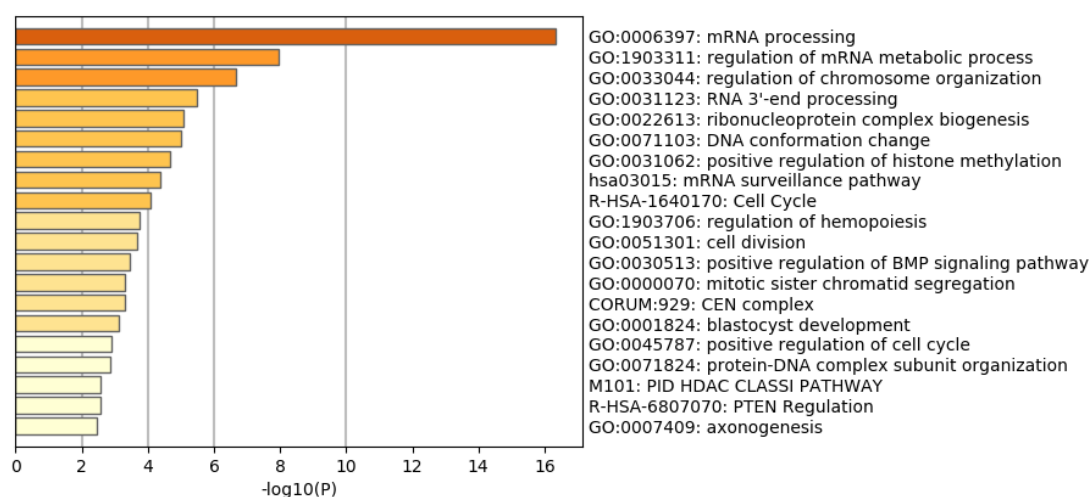


Figure 6. Processus cellulaires dans lesquels SHP1 intervient.

Des cellules HCT116 FlpIn T-rex exprimant une protéine de fusion TurboID-SHP1 inducible ont permis d'identifier par spectrométrie de masse différents partenaires d'interaction de SHP1. Les peptides identifiés ont été analysés avec le logiciel SAINT. Toutes les cibles ayant un SAINT score supérieur à 0,7 ont été analysées par le logiciel Metascape. Ce dernier a regroupé les cibles obtenues selon les fonctions pour lesquelles les protéines sont reconnues. Ce logiciel a généré ces groupes de cibles rassemblées selon les processus cellulaires dans lesquels ils opèrent. Image générée par le logiciel Metascape (Zhou et al., 2019).

Sachant que la sous-expression de SHP1 corrélait avec une hypertrophie cellulaire, et sachant que deux acteurs contrôlant la synthèse protéique étaient modulés, nous nous sommes ensuite intéressés à mesurer la synthèse protéique dans nos populations de cellules sous-exprimant SHP1. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique SUnSET qui consiste à incuber les cellules avec 10 μ M de puromycine. Ensuite, par immunobuvardage, nous sommes capables de détecter la puromycine qui a intégré les peptides naissants, et l'intensité du patron observé permet de déterminer le taux de protéines synthétisées. De cette façon, nous avons observé tant dans les HCT116 que les HT29 que la puromycine est légèrement plus fortement détectée dans les cellules shSHP1 de 5% et de 10% respectivement, que dans

les cellules shSCR contrôles, et donc qu'il semble y avoir taux de synthèse protéique supérieur quand SHP1 est sous-exprimé. Nous avons également confirmé que chez la souris, l'hypertrophie cellulaire observée était aussi associée à une hausse de la synthèse protéique. En effet, sachant que la phosphorylation de la prS6 sur les sérines 235 et 236 est augmentée de 5,4X dans l'épithélium intestinal des souris *Shp1*^{CEI-KO} (Leblanc et al., 2017), nous avons validé que la phosphorylation de eEF2 sur sa thréonine 57 est réduite de 70% (Fig. 7D), indiquant une hausse de son activité. Finalement, nous avons confirmé que la synthèse protéique était bien augmentée dans les souris *Shp1*^{CEI-KO} par détection de la puromycine en immunobuvardage réalisé sur des enrichissements d'épithélium suivant une injection intrapéritonéale de puromycine où nous avons noté une augmentation de 36% chez les souris expérimentales comparativement aux souris contrôles. (Fig. 7E).

Ensemble, nos résultats indiquent que SHP1, tant dans l'épithélium intestinal de souris que dans des cellules cancéreuses colorectales humaines en culture, inhibe la croissance cellulaire en contrôlant notamment la synthèse protéique.

SECTION 1.2 : RÉGULATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/ β -CATÉNINE

Plusieurs travaux antérieurs du laboratoire ont suggéré que SHP1 pouvait contrôler la croissance cellulaire, et plus précisément la prolifération, via la régulation de la voie Wnt/ β -caténine (Duchesne et al., 2003; Simoneau et al., 2011). De plus, durant ma maîtrise, nous avons aussi observé que la perte de SHP1 dans les cellules épithéliales intestinales chez la souris menait à une forte expression de la β -caténine (Leblanc, 2015), suggérant une stabilisation de celle-ci. Nous avons voulu analyser si SHP1 était effectivement un régulateur important de l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et ce, à l'aide de notre modèle murin invalidé pour SHP1 dans les CEIs.

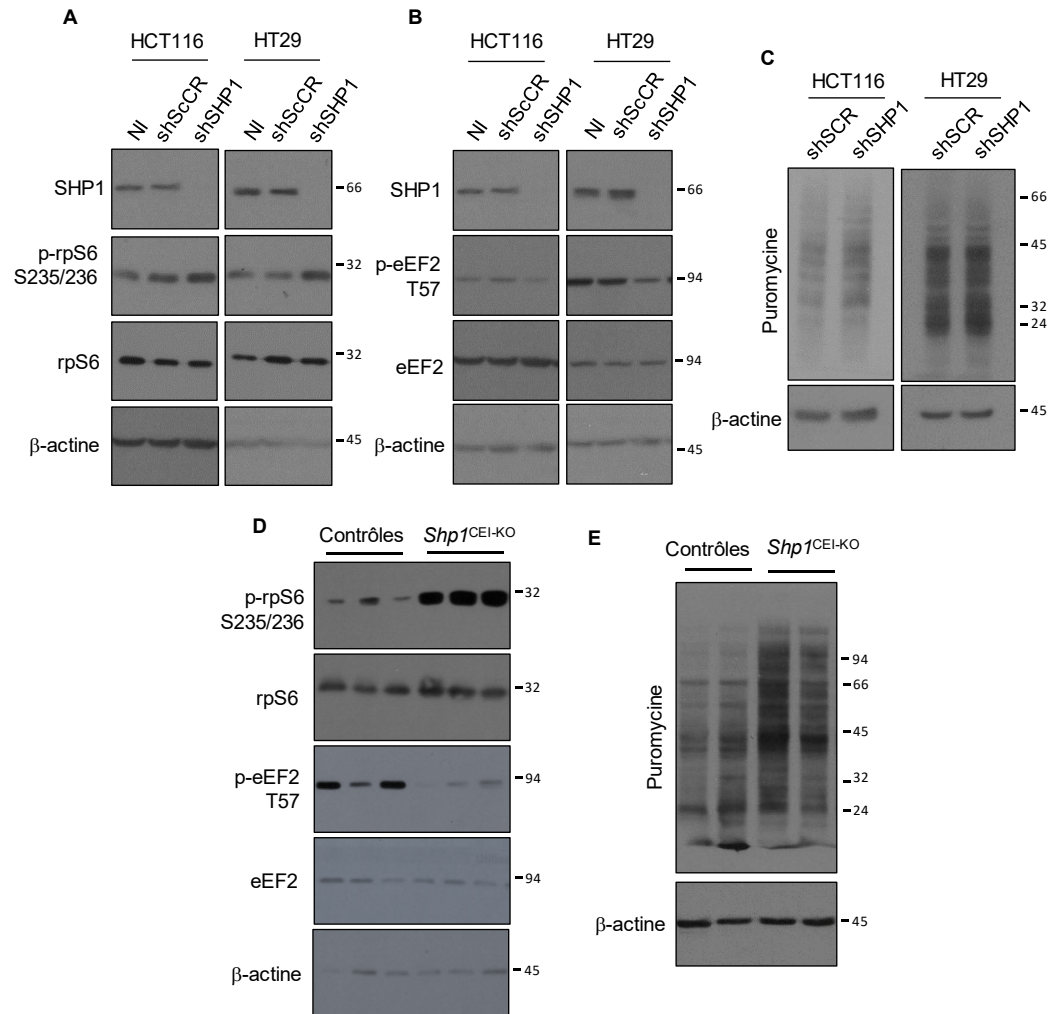


Figure 7. SHP1 contrôle la synthèse protéique.

A. Des cellules contrôles (shSCR) et sous-exprimant SHP1 (shSHP1) ont été privées en FBS pendant 18 h, pour être stimulées pendant 15 min avec du FBS, puis lysées. La phosphorylation de rpS6 sur les sérines 235/236 a été détectée par immunobuvardage, de même que les niveaux totaux de SHP1 et de rpS6. L'actine a servi de contrôle de charge. **B.** Les cellules ont été traitées de la même façon que décrit ci-haut. La phosphorylation de eEF2 sur la thréonine 57 a été détectée par immunobuvardage, de même que les niveaux totaux de SHP1 et de eEF2. L'actine a servi de contrôle de charge. **C.** Les populations de HCT116 et de HT29 contrôles (shSCR) et sous-exprimant SHP1 (shSHP1) ont été incubées pendant 1 h avec 10 μ M de puromycine. La puromycine a ensuite été détectée par immunobuvardage. L'actine a servi de contrôle de charge. **D.** Les phosphorylations de la rpS6 et de eEF2 ont été évaluées par immunobuvardage sur des enrichissements d'épithéliums de jejunum de souris contrôles et *Shp1*^{CEI-KO} de 6 sem. Les niveaux totaux de rpS6 et de eEF2 ont aussi été évalués. L'actine a servi de contrôle de charge. **E.** Des souris contrôles et *Shp1*^{CEI-KO} ont reçu une injection intrapéritonéale de 4 μ L/g de 10 mM de puromycine (pour avoir environ 1 μ mol de puromycine par souris), 30 min avant l'euthanasie. La puromycine a été détectée par immunobuvardage sur un enrichissement d'épithélium intestinal. L'actine a servi de contrôle de charge.

1.2.1 Hausse du niveau total et non phosphorylé de la β -caténine dans l'épithélium intestinal des souris *Shp1*^{CEI-KO}.

Afin de déterminer si la perte de SHP1 était capable d'induire une hyperactivation de la signalisation Wnt/ β -caténine, nous avons d'abord évalué les niveaux d'expression protéique de la β -caténine, de même que de sa forme dite active, soit sa forme non phosphorylée sur les résidus sérine 33/37 et thréonine 41, et donc non ciblée pour dégradation dans le protéasome. Nous avons ainsi observé une hausse de 2,4X du niveau d'expression protéique total de la β -caténine dans des enrichissements d'épithélium de nos souris expérimentales, de même qu'une augmentation de 2,2X de sa forme active (Fig. 8A), ce qui suggère qu'il y aurait moins de dégradation de la β -caténine suivant la perte de SHP1. Nous avons déjà montré que la voie PI3K/AKT/mTOR était hyperactivée dans notre modèle de souris *Shp1*^{CEI-KO} (Leblanc, 2015; Leblanc et al., 2017). Nous nous sommes donc intéressés à évaluer la phosphorylation inhibitrice sur la sérine 9 de la GSK3 β , connue pour être effectuée notamment par AKT (Cross et al., 1995). De façon intéressante, nous avons noté une augmentation de 3X de la phosphorylation de GSK3 β sur la sérine 9 dans l'épithélium des souris *Shp1*^{CEI-KO} comparativement aux souris contrôles (Fig. 8B). De plus, nous avons observé une hausse de 3,8X de la phosphorylation de la sérine 552 de la β -caténine, connue elle aussi pour être médiée par AKT, et qui modulerait à la hausse son activité transcriptionnelle (Fang et al., 2007). Ces résultats semblent donc indiquer que la stabilisation de la β -caténine observée pourrait, au moins en partie, provenir de l'activation de la voie PI3K/AKT.

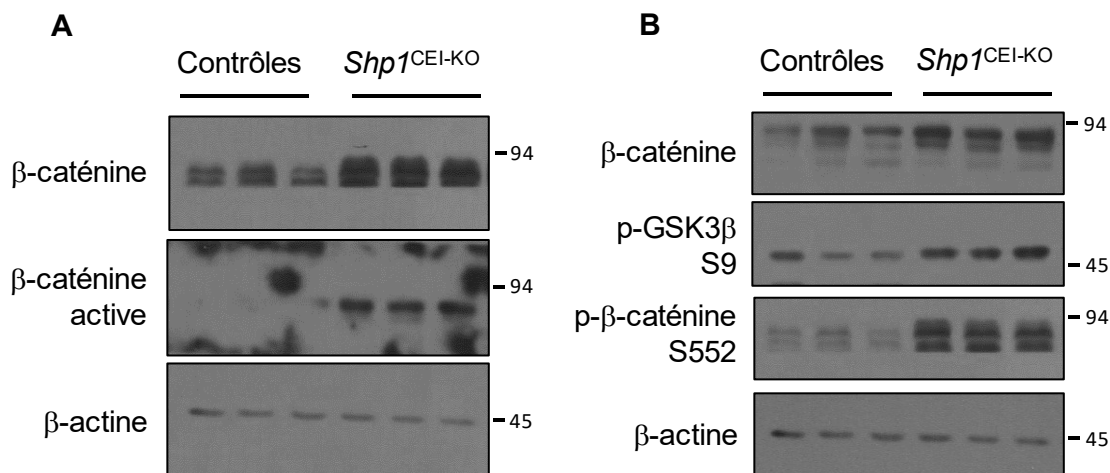


Figure 8. La perte d'expression de SHP1 dans l'épithélium intestinal mène à une augmentation du niveau d'expression de la β -caténine dans le jéjunum de souris.

A. L'expression de la β -caténine et de sa forme active, ont été évaluées par immunobuvardage, fait sur des extraits d'enrichissement d'épithéliums de jéjunums de souris âgées de 6 sem. L'actine a servi de contrôle de charge. **B.** Les niveaux de β -caténine, de sa forme phosphorylée sur la sérine 552, et de la forme phosphorylée de la GSK3 β sur la sérine 9 ont été évalués par immunobuvardage sur des extraits d'enrichissement d'épithéliums de jéjunums de souris âgées de 6 sem.

1.2.2 Hausse de l'expression et de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans le noyau des CEIs des souris *Shp1*^{CEI-KO}

Par la suite, nous avons voulu valider si la voie Wnt/ β -caténine était bel et bien hyperactivée suivant la perte de SHP1 dans les CEIs. Pour que cette voie de signalisation soit considérée comme étant activée, il faut que la β -caténine transloque au noyau, lie son partenaire transcriptionnel de la famille TCF et transcrive des gènes cibles. C'est ce que nous avons donc évalué ensuite à l'aide d'un fractionnement cytoplasme-noyau réalisé sur des extraits d'enrichissement de cryptes de souris. Nous avons pu ainsi observer que la quantité de β -caténine cytoplasmique et nucléaire chez les souris contrôles était relativement similaires (Fig.10A les pistes 1 à 3 comparées aux pistes 7 à 9, B). De manière très intéressante, nous avons aussi noté que la quantité de β -caténine cytoplasmique était significativement inférieure de 43% dans les extraits provenant des souris expérimentales, comparativement à ceux des souris contrôles (Fig. 9A pistes 1 à 3 comparées aux pistes 4 à

6, B). À l'inverse, nous avons noté une augmentation significative de 2,9X% de la quantité de β -caténine nucléaire dans les extraits nucléaires provenant des souris expérimentales en comparaison avec les extraits cytoplasmiques de ces mêmes souris (Fig. 9A pistes 4 à 6 comparées aux pistes 10 à 12, B), de même qu'une augmentation significative de 72% de la quantité de β -caténine nucléaire chez les souris expérimentales comparativement aux souris contrôles (Fig. 9A pistes 7 à 9 comparées aux pistes 10 à 12, B). Le fractionnement cyto-noyau illustre donc une relocalisation importante de la β -caténine vers le noyau des cellules qui composent les cryptes chez les souris *Shp1*^{CEI-KO}. Cette observation a également été confirmée par une immunohistochimie dirigée contre la β -caténine, où elle apparaît plus nucléaire dans les cellules prolifératives des souris expérimentales que chez leurs contrôles (Fig. 9C, flèches blanches) en plus d'être normalement nucléaire dans les cellules de Paneth localisées tout au fond des cryptes (Fig. 9C, flèches noires).

Finalement, pour confirmer que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est bien hyperactivée dans les CEIs des souris *Shp1*^{CEI-KO}, nous avons analysé par qPCR l'expression de gènes cibles spécifiques de cette voie, et qui sont aussi connus pour être impliqués dans le maintien des cryptes (Batlle et al., 2002; Blache et al., 2004). Ainsi, nous avons noté que *Sox9* et *EphB3* sont tous les deux significativement plus exprimés chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} que chez les souris contrôles (Fig. 9D).

Mis ensemble, ces résultats indiquent que la perte d'expression de SHP1 dans les CEIs entraîne effectivement une hyperactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

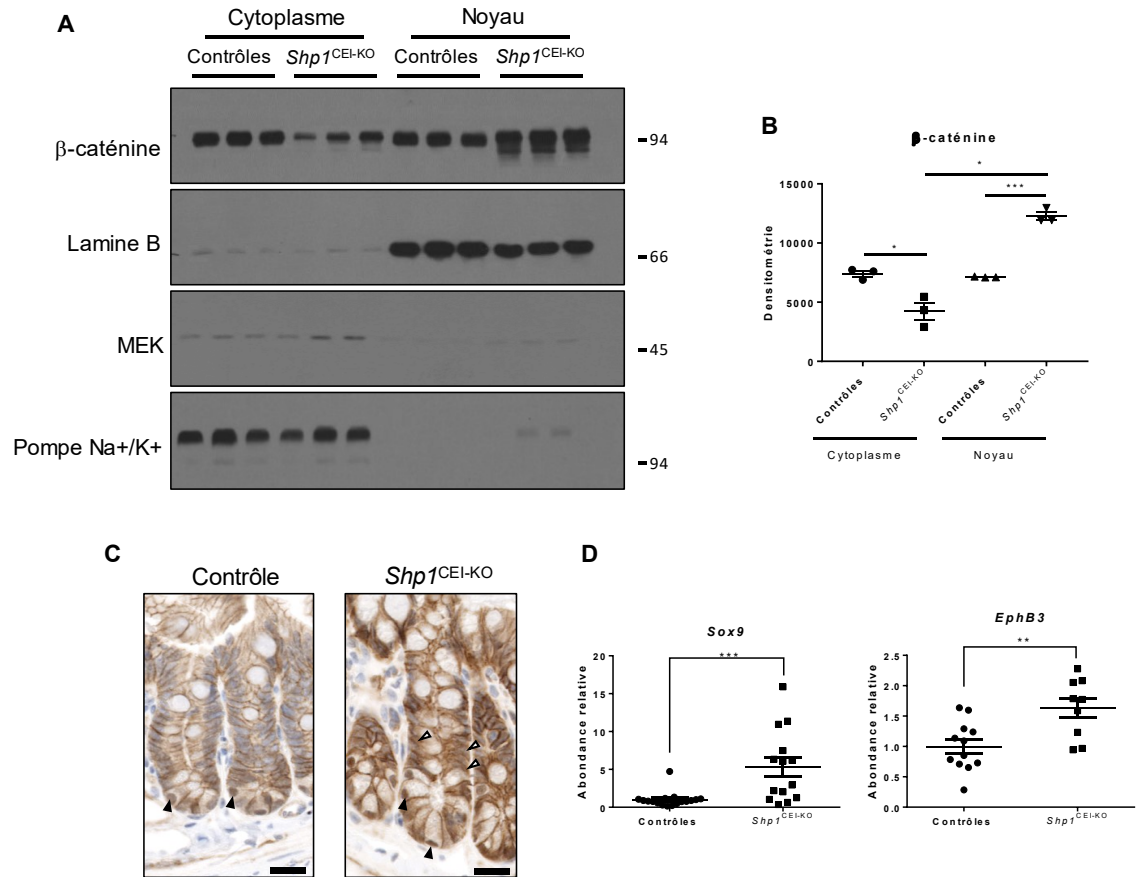


Figure 9. La perte d'expression de SHP1 dans l'épithélium intestinal mène à une hyperactivation de la voie Wnt/β-caténine dans le jéjunum de souris.

A. Un fractionnement cyto-noyau a été effectué sur des enrichissements de cryptes pour évaluer la quantité de β-caténine cytoplasmique et nucléaire. La β-caténine a été observée par immunobuvardage. La lamine B a servi de contrôle pour l'enrichissement nucléaire. Mek a servi de contrôle l'enrichissement cytoplasmique. La pompe Na⁺/K⁺ permet de visualiser l'enrichissement de la fraction membranaire. **B.** Quantification de l'expression de la β-caténine dans le fractionnement cyto-noyau (*p≤0,05; ***p≤0,001). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. **C.** La localisation de la β-caténine est observée par immunohistochimie sur des coupes de jéjunum moyen de souris âgées de 6 sem. Barre de calibration = 20 μm. Flèches noires = noyau de cellules de Paneth marqués pour la β-caténine. Flèches blanches = noyau de cellules progénitrices prolifératives marqués pour la β-caténine. **D.** Abondance relative évaluée par qPCR de *Sox9* (n≥14) et de *EphB3* (n≥9) dans des extraits enrichis d'épithéliums de jéjunum. L'abondance relative a été normalisée sur les gènes *Txn14b*, *Pum1* et *Tbp* (*p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

SECTION 1.3 : ALTÉRATION DES CELLULES SOUCHES DANS L'ÉPITHÉLIUM DES SOURIS *SHP1*^{CEI-KO}

Sachant que la voie Wnt/ β -caténine est connue pour son rôle crucial dans le maintien et la prolifération des cellules souches intestinales (Kretzschmar and Clevers, 2017; Mah et al., 2016), nous nous sommes intéressés à déterminer si SHP1 était capable d'affecter ce type cellulaire particulier via son action sur la voie Wnt/ β -caténine.

1.3.1 La perte de SHP1 affecte la population de cellules souches

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression de différents gènes exprimés dans les cellules souches. Nous avons notamment analysé l'expression en qPCR de *Dclk1* et *Ascl2*, deux gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine, qui sont respectivement des marqueurs de cellules Tuft, dont une sous-population contribue au maintien de la niche des cellules souches, et un facteur de transcription impliqué dans le maintien de l'identité de ces cellules souches (Middelhoff et al., 2017; Schuijers et al., 2015; Westphalen et al., 2017; Yan and Kuo, 2015). De façon intéressante, nous avons noté une augmentation significative de l'expression de ces deux gènes chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} comparativement aux souris contrôles (Fig. 10A). Ces résultats permettent par le fait même de confirmer que des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine sont plus transcrits, et donc que cette signalisation est plus activée suivant la perte de SHP1 dans les CEIs. Nous avons aussi évalué par qPCR l'expression de *Olfm4* et de *Bmi1*, deux marqueurs des populations de cellules souches (van der Flier et al., 2009; López-Arribillaga et al., 2015) mais qui sont plutôt des gènes cibles de la voie NOTCH (López-Arribillaga et al., 2015; VanDussen et al., 2012). Nous n'avons noté aucune modulation de l'expression de ces deux gènes (Fig. 10B), suggérant que le niveau d'activation de cette voie n'est probablement pas affecté par la perte d'expression de SHP1 dans l'épithélium intestinal. Néanmoins, nous avons réalisé une immunohistochimie contre OLFM4 (Fig. 10C) qui est souvent utilisé pour visualiser les cellules souches. De façon surprenante, une hausse de près de 20% du nombre de cellules positives pour la protéine OLFM4 a été notée chez les souris expérimentales comparativement aux contrôles (Fig. 10D).

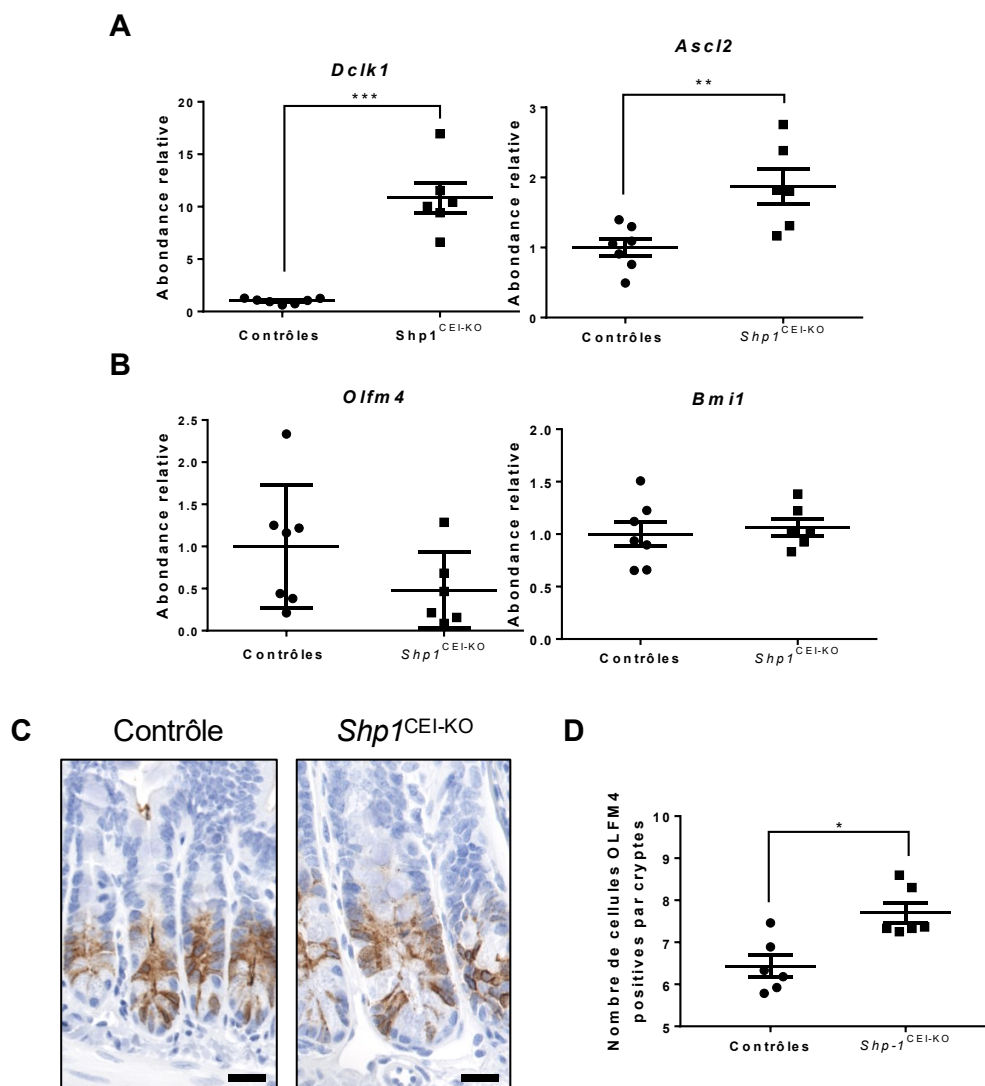


Figure 10. L'activité des cellules souches intestinales est affectée par l'absence de SHP1.

A-B. Abondance relative évaluée par qPCR de *Dclk1*, *Ascl2*, *Olfm4* et *Bmi1* dans des extraits enrichis d'épithéliums de jéjunum de souris âgées de 6 sem. L'abondance relative a été normalisée sur les gènes *Txn14b*, *Pum1* et *Tbp* ($n \geq 6$). **C.** Immunohistochimie contre OLFM4 réalisée sur des coupes de jéjunum moyen de souris de 6 sem. Barre de calibration = 20 μ m. **D.** Décompte du nombre de cellules positives pour OLFM4 par crypte. Au moins 9 cryptes ont été comptées par souris ($n=6$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

1.3.2 Les organoïdes des souris *Shp1^{CEI-KO}* se développent anormalement

Afin de mieux déterminer si la perte de SHP1 affecte l'activité des cellules souches de l'intestin grêle murin, nous nous sommes tournés vers un modèle *ex vivo*, soit la culture

d'organoïdes. Des cryptes de jéjunum de souris contrôles et de souris *Shp1*^{CEI-KO} ont donc été isolées puis ensemencées dans du Matrigel, et leur développement a été suivi quotidiennement. Le développement normal d'un organoïde mène à la formation de ramifications autour du corps des organoïdes. Ces ramifications récapitulent les cryptes de l'intestin grêle. En effet, aux extrémités de ces ramifications se trouvent les cellules souches et les cellules de Paneth, suivies des cellules progénitrices prolifératives. Le corps de l'organoïde quant à lui est composé des cellules épithéliales intestinales différenciées, comme le serait normalement composée une villosité. Évidemment, ces cellules différenciées proviennent des cellules prolifératives des ramifications qui migrent et de différencient vers les villosités, de la même façon que les cellules le font dans un axe crypte-villosité dans un intestin (Short et al., 2017). À 5 jours suivant leur ensemencement, nous avons observé une baisse significative du nombre de ramifications chez les organoïdes invalidés pour SHP1 en comparaison avec les organoïdes contrôles (Fig. 11A, B). Cette différence pouvant provenir d'un problème lors de l'ensemencement, nous avons évalué si les organoïdes contrôles et *Shp1*^{CEI-KO} débutaient leur croissance sur une base égale. L'aire relative des organoïdes a ainsi été mesurée le lendemain de leur ensemencement (Fig. 11C). De façon intéressante, aucune différence significative quant à l'aire relative des organoïdes contrôles et *Shp1*^{CEI-KO} n'a été observé (Fig. 11D), indiquant que la perte de SHP1 n'interfère pas avec l'isolement et l'ensemencement des organoïdes. Nous nous sommes également intéressés à déterminer si le problème de développement des ramifications observé provenait d'un problème de survie engendré par la perte de SHP1. Cependant, encore une fois, aucune différence significative n'a été observée (Fig. 11E). Finalement, nous avons évalué la prolifération par incorporation d'EdU, et étonnamment, nous avons observé une augmentation significative du nombre de cellules EdU positives par crypte (Fig. 11F-G), indiquant que la perte de SHP1 dans les organoïdes d'intestin grêle mène bien à une hausse de la prolifération cellulaire.

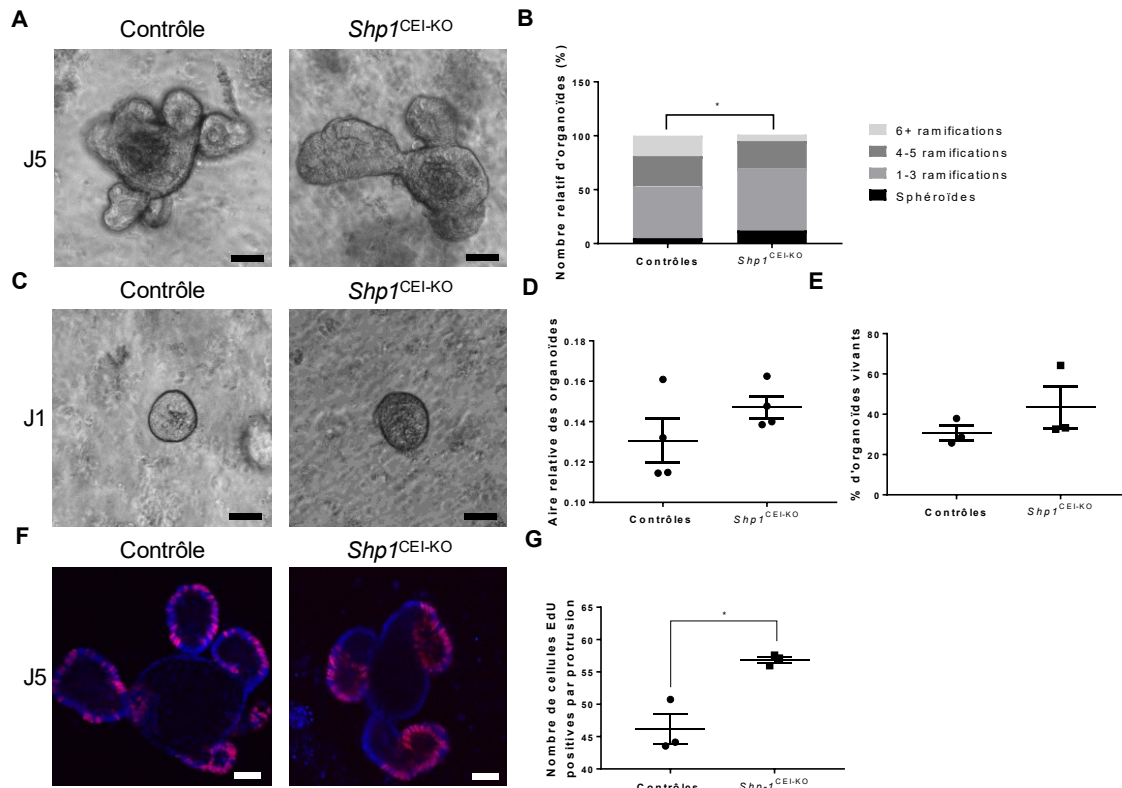


Figure 11. Le développement d'organoïdes d'intestin grêle est altéré par l'absence de SHP1 dans les cellules épithéliales intestinales.

A. Photos en contraste de phase représentatives d'organoïdes de jéjunum de souris de 8 sem, 5 jours post-ensemencement. Barre de calibration = 50 μ m. **B.** Graphique représentatif de 3 expériences indépendantes du nombre de ramifications présentes par organoïde. Au moins 40 organoïdes ont été comptés. **C.** Photos en contraste de phase représentatives d'organoïdes de jéjunum de souris de 8 sem, au lendemain de leur ensemencement. Barre de calibration = 50 μ m. **D.** Mesure de l'aire relative des organoïdes au lendemain de leur ensemencement. Au moins 10 organoïdes ont été mesurés (n=4). **E.** La viabilité des organoïdes a été évaluée à 5 jours post-ensemencement (n=3). **F.** Photo représentative d'organoïdes de jéjunum de souris de 8 sem suivant 1h d'incorporation à l'EdU. Barre de calibration = 50 μ m. **G.** Décompte du nombre de cellules EdU positives par ramification. Au moins 17 ramifications ont été comptées par condition. (n=3, *p \leq 0,05). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

1.3.3 Une hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine est responsable du phénotype des organoïdes *Shp1*^{CEI-KO}

Considérant le nombre réduit de ramifications à la surface de organoïdes invalidés pour SHP1, nous avons d'abord suspecté un retard de croissance. Cependant, les organoïdes *Shp1*^{CEI-KO} sont hyperprolifératifs, rappelant la légère hausse de la prolifération cryptale déjà observée chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} comparées aux souris contrôles (Leblanc et al., 2017). De façon intéressante, il est connu que des organoïdes traités avec du WNT3 exogène (Fenderico et al., 2019; Rodríguez-Colman et al., 2017) ou des organoïdes de souris présentant une hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine (Onuma et al., 2013) vont présenter une hyperprolifération cellulaire avec peu de ramifications. Considérant que la perte de SHP1 dans les CEIs chez la souris induit une hausse de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, nous nous sommes intéressés à moduler le niveau d'activation de cette voie dans nos organoïdes afin de voir si on pouvait rétablir un « phénotype » normal. Pour permettre la croissance des organoïdes, le milieu de culture utilisé est supplémenté avec différents produits, dont la R-Spondine, que nous utilisons normalement à 10%. La R-Spondine active fortement la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules souches (Carmon et al., 2011; Ruffner et al., 2012). Nous avons donc réduit à 5% la quantité de R-Spondine présente dans notre milieu de culture. Sans surprise, la culture d'organoïdes contrôles avec seulement 5% de R-Spondine affecte leur développement, tel qu'observé par la diminution du nombre de ramifications (Fig. 12A, panneaux du bas). Cependant, de façon très intéressante, le développement des organoïdes *Shp1*^{CEI-KO} semble restauré au même niveau que les organoïdes contrôles cultivés en milieu 10% R-Spondine (Fig. 12A). Le tout a été validé par un décompte du nombre de ramifications composant les organoïdes (Fig. 12B).

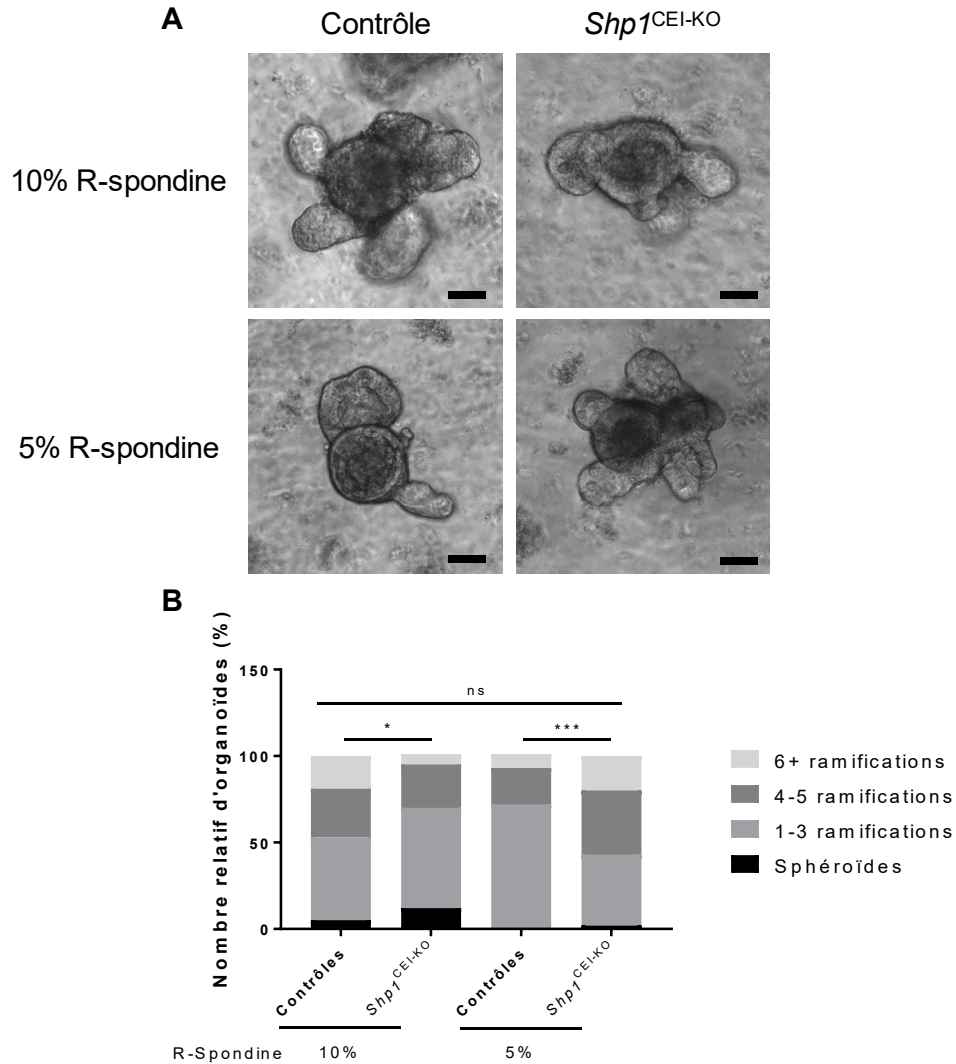


Figure 12. L'hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine est responsable de l'altération du développement des organoïdes déficients pour l'expression de SHP1.

A. Photos en contraste de phase représentatives d'organoïdes de jéjunums de souris de 8 sem, 5 jours post-ensemencement, cultivés avec du milieu supplémenté à 10% ou 5% R-Spondine. Barre de calibration = 50 μ m. **B.** Le nombre de ramifications par organoïde a été calculé et comparé en fonction du pourcentage de R-Spondine présente dans le milieu de culture. Graphique représentatif de 3 expériences indépendantes (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

Mis ensemble, tous ces résultats indiquent que la perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal est un régulateur important de son homéostasie. En effet, SHP1 régule la synthèse protéique et la croissance cellulaire. De plus c'est un régulateur négatif de la voie Wnt/ β -caténine, interférant ainsi avec l'activité des cellules souches.

Chapitre 2 : Implication de SHP1 dans le cancer colorectal et l'inflammation intestinale

Considérant son impact sur l'homéostasie intestinale, il ne serait pas surprenant que SHP1 puisse être impliqué dans le développement et/ou la progression de certaines maladies relatives à l'intestin, et plus précisément à l'épithélium intestinal. Nous avons donc vérifié l'implication potentielle de SHP1 dans le développement du cancer colorectal et de l'inflammation intestinale.

SECTION 2.1 : LE CANCER COLORECTAL

SHP1 est une tyrosine phosphatase connue comme étant un suppresseur de tumeur dans différents types de cancers, notamment les lymphomes et les hépatocarcinomes (Wen et al., 2018; Wu et al., 2003b; Zhang et al., 2005). Considérant le rôle que semble avoir SHP1 dans l'épithélium intestinal relativement au contrôle de la voie Wnt/ β -caténine, une voie cruciale dans le développement du cancer colorectal (Deitrick and Pruitt, 2016; Morin et al., 1997), nous nous sommes intéressés à approfondir le rôle de SHP1 dans ce type de cancer.

2.1.1 L'expression de *PTPN6* est réduite dans le cancer colorectal

D'abord, nous avons évalué par qPCR l'expression de *PTPN6*, le gène qui code pour SHP1, dans 48 tumeurs colorectales humaines paires de différents stades provenant notre biobanque locale (directrice : Dre Julie Carrier). Nous avons ainsi observé que le niveau des transcrits de *PTPN6* était significativement réduit dans les adénomes et les tumeurs de stade 2 par rapport à leur marge saine (Fig. 13A). Cependant, lorsque l'expression de *PTPN6* est directement comparée entre une tumeur et celle de sa marge saine pairée, nous observons que dans la grande majorité des tumeurs, nous observons une réduction de l'expression de *PTPN6* par rapport à sa marge saine. Au global, une réduction significative de *PTPN6* est observée dans les tumeurs colorectales, tous stades confondus (Fig. 13B). Pour étendre notre échantillonnage, nous avons utilisé l'interface TCGA-Wanderer afin d'examiner 262 tumeurs colorectales dont les données de séquençage sont publiquement disponibles. Nous

avons là aussi observé que l'expression de *PTPN6* est significativement réduite dans les adénocarcinomes colorectaux comparativement aux tissus normaux (Fig. 13C).

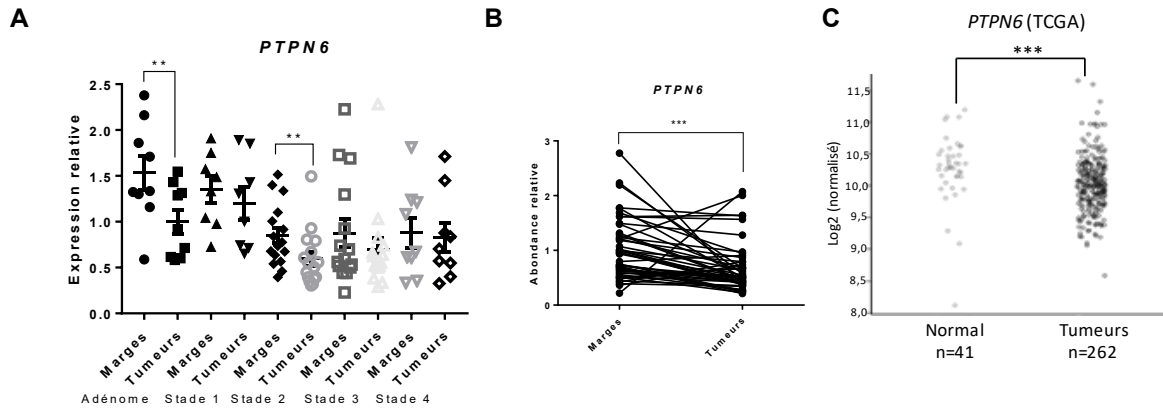


Figure 13. L'expression de *PTPN6* est réduite dans les tumeurs colorectales.

A. L'expression relative de *PTPN6* a été évaluée par qPCR dans des marges et des tumeurs colorectales humaines à différents stades. Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne (n=48). **B.** L'expression de *PTPN6* dans chaque tumeur colorectale est comparée avec son expression dans la marge de résection saine pairée, prélevée du même patient (n=48). L'abondance relative a été normalisée sur les gènes *FLT3LG*, *MRPL19* et *PUM1*. **C.** L'expression de *PTPN6* dans 262 tumeurs colorectales humaines et 7 tissus sains est tirée de la base de données publique disponible de TCGA (**p≤0,01; ***p≤0,001).

2.1.2 Impact de SHP1 sur la croissance de cellules cancéreuses colorectales

Nous nous sommes ensuite intéressés à déterminer l'impact de la diminution d'expression de SHP1 sur la prolifération des cellules cancéreuses déjà établies. Nous avons donc utilisé les populations de HCT116 et de HT29 infectées avec un shARN contrôle (shSCR) ou un shARN ciblant SHP1 (shSHP1). La prolifération de ces populations de cellules a été évaluée par une incorporation d'EdU, précédée par une privation en FBS de 18 h et suivie d'une stimulation au FBS de 1 h. Étonnamment, la prolifération des HCT116 et des HT29 n'a pas été affectée par la baisse d'expression de SHP1 puisqu'aucune différence significative dans le pourcentage de cellules EdU positives n'a été observée (Fig. 14A-D). Nous nous sommes par la suite intéressés à déterminer si les propriétés tumorales de ces cellules pouvaient être modulées par l'expression de SHP1. Des essais de croissance en

indépendance d'ancrage ont donc été réalisés sur les populations de HCT116 et de HT29 contrôles ou sous-exprimant SHP1. Le nombre de colonies qui se sont formées suivant l'ensemencement de cellules en agarose mou indique que la baisse d'expression de SHP1 augmente la capacité des cellules cancéreuses colorectales à croître en indépendance d'ancrage. En effet, une augmentation significative du nombre de colonies a été notée dans les cellules sous-exprimant SHP1, tant dans les HCT116 que les HT29 (Fig. 15A-D). Ces résultats nous suggèrent donc que la baisse d'expression de SHP1 ne semble pas suffisante à accélérer la prolifération de cellules cancéreuses colorectales, mais est tout de même suffisante pour moduler la croissance en indépendance d'ancrage.

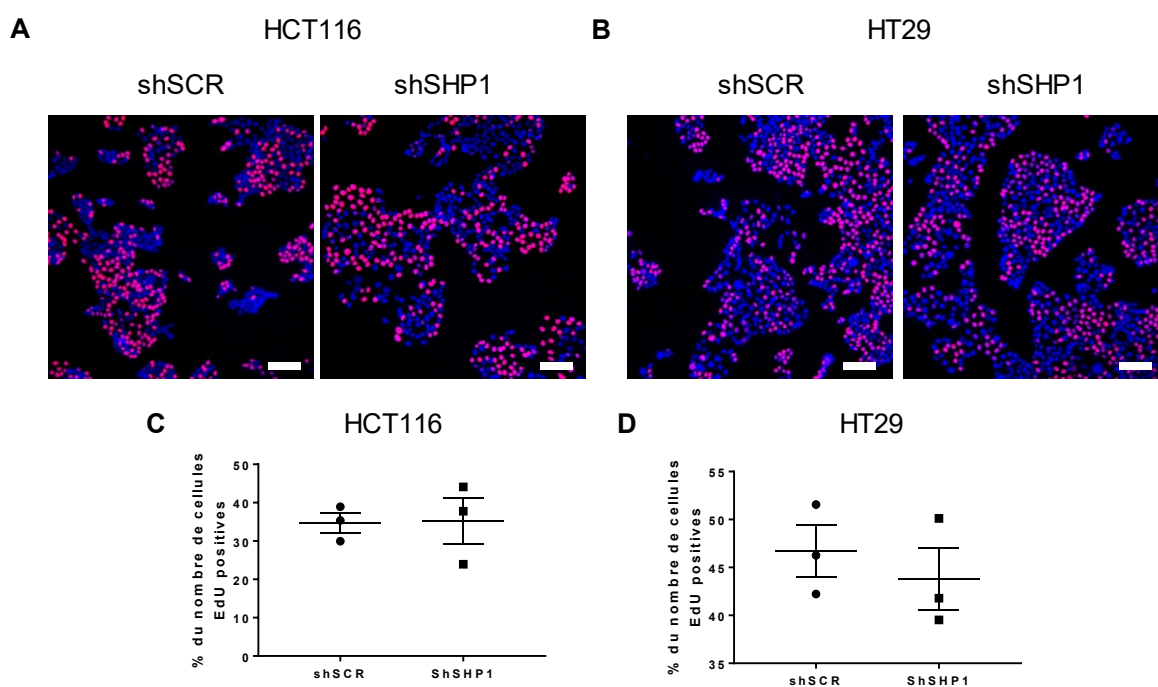


Figure 14. La prolifération des cellules cancéreuses colorectales n'est pas affectée par l'expression de SHP1.

A-D. La prolifération est observée par la détection d'EdU en fluorescence suivant 1h d'incorporation sur des populations de HCT116 (**A**) et de HT29 (**B**) contrôles ou sous-exprimant SHP1. Barre de calibration = 100 μ m. Le pourcentage de cellules prolifératives (EdU positives) a été calculé pour les HCT116 (**C**) et les HT29 (**D**) (n=3). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

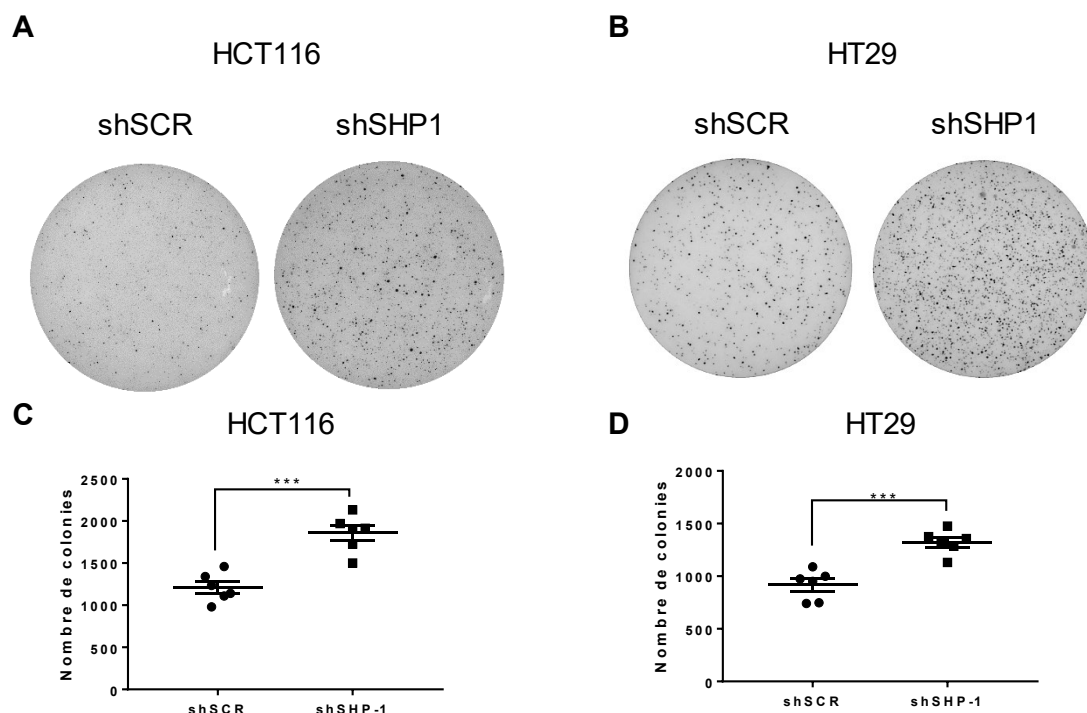


Figure 15. La sous-expression de SHP1 dans des cellules cancéreuses augmente leur potentiel à croître en indépendance d'ancrage.

A-D. Des populations de HCT116 (**A**) et de HT29 (**B**) contrôles ou sous-exprimant SHP1 ont été ensemencées en agarose mou pour évaluer leur capacité à former des colonies en indépendance d'ancrage. Les colonies formées en indépendance d'ancrage ont été dénombrées pour les HCT116 (**C**) et les HT29 (**D**). Graphiques représentatifs de 3 expériences indépendantes par lignée de cellules (n=3. ***p≤0,001). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

2.1.3 Les souris *Shp1*^{CEI-KO} ne forment pas de tumeurs avec l'âge

Afin de mieux déterminer si SHP1 est un suppresseur de tumeur dans l'épithélium intestinal, nous avons laissé vieillir une cohorte de souris contrôles et de souris *Shp1*^{CEI-KO} jusqu'à 15 mois. Lors de l'euthanasie des animaux, aucune tumeur n'a été observée chez les souris mutantes. Nous avons néanmoins vérifié si les souris *Shp1*^{CEI-KO} âgées de 15 mois exhibaient le même phénotype que celui que nous avons caractérisé à 6 semaines. La principale altération phénotypique observée chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} est l'intestinalomégalie qui se développe rapidement (Leblanc et al., 2017). À 15 mois, nous avons constaté que cette intestinalomégalie était toujours observée. En effet, le poids de l'intestin grêle, de même que le ratio poids/longueur d'intestin est encore significativement

plus élevé chez les souris expérimentales que chez les souris contrôles, et ce même si la longueur de l'intestin n'est pas significativement augmentée (Fig. 16A-C). De plus, les souris *Shp1*^{CEI-KO} à 15 mois présentent également une augmentation de la hauteur des cryptes dans le jéjunum (Fig. 16D et F). Nous avons également caractérisé que les souris invalidées pour SHP1 dans les CEIs présentaient des altérations dans la différenciation cellulaire. De façon similaire aux souris âgées de 6 semaines, les souris expérimentales de 15 mois présentent un nombre accru de cellules caliciformes (Fig. 16E et G), de même qu'une augmentation du nombre de cellules de Paneth positives au lysozyme (Fig. 16H et I). Ces observations nous suggèrent donc que le phénotype d'intestinalomégalie et de différenciation associée à la perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal est conservé avec l'âge. Par la suite, nous avons évalué la prolifération cellulaire par immunohistochimie contre Ki67 car nous avons suspecté que la perte de SHP1 dans les CEIs n'était peut-être plus suffisante pour maintenir l'hyperprolifération cryptale à 15 mois. Effectivement, aucune différence significative du nombre de cellules positives au Ki67 n'a été observée entre les souris contrôles et les souris *Shp1*^{CEI-KO} (Fig. 17A-B). Nous avons également réalisé une immunohistochimie contre la β -caténine afin d'observer son expression et sa localisation, et contrairement aux souris à 6 semaines, les souris expérimentales de 15 mois ne présentent pas d'augmentation de la β -caténine nucléaire dans les cellules progénitrices prolifératives lorsque comparées aux souris contrôles (Fig. 17C). Cette dernière observation suggère que des mécanismes de compensation se sont probablement installés pour maintenir un niveau d'activation acceptable de la signalisation Wnt/ β -caténine dans les cellules épithéliales intestinales invalidées pour SHP1. Ainsi, l'absence d'hyperprolifération ainsi que de β -caténine nucléaire pourraient expliquer l'absence de développement de tumeurs intestinales chez les souris *Shp1*^{CEI-KO}.

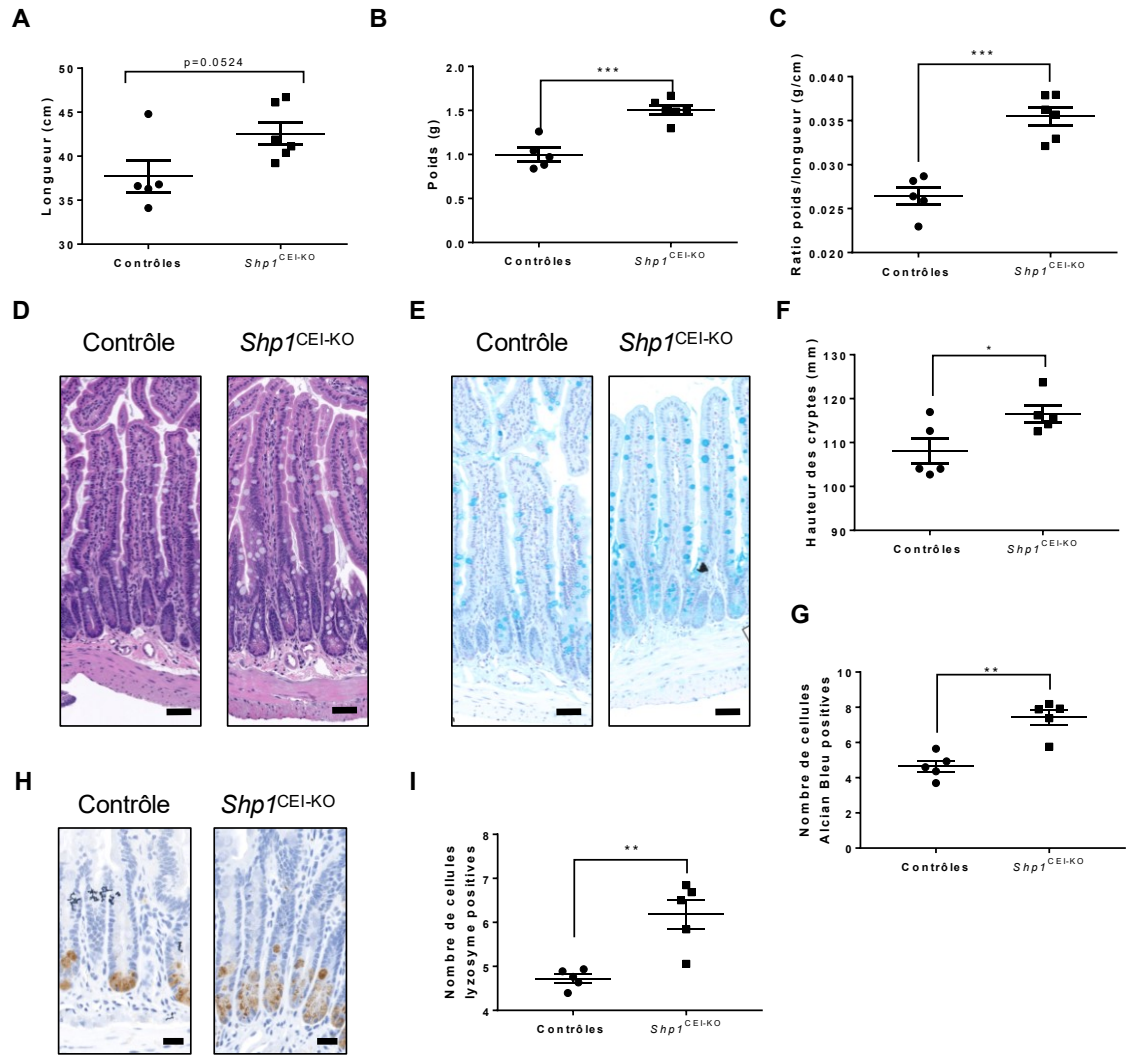


Figure 16. Le phénotype intestinal des souris *Shp1*^{CEI-KO} est maintenu à 15 mois.

A. La longueur de l'intestin grêle a été mesurée (n≥5). **B.** Le poids de l'intestin grêle a été mesuré (n≥5). **C.** Le ratio du poids de l'intestin sur sa longueur a été calculé (n≥5). **D.** L'architecture du jéjunum moyen est observée par une coloration à l'hématoxyline et éosine. Barre de calibration = 50 µm. **E.** Les cellules caliciformes dans le jéjunum moyen sont colorées à l'Alcian Bleu. Barre de calibration = 50 µm. **F.** La hauteur des cryptes du jéjunum a été mesurée sur au moins 20 cryptes par souris (n=5). **G.** Le nombre de cellules Alcian Bleu positives par crypte a été calculé sur au moins 8 cryptes par souris (n=5). **H.** Immunohistochimie contre le lysozyme pour visualiser les cellules de Paneth. Barre de calibration = 20 µm. **I.** Le nombre de cellules lysozyme positives par crypte a été compté sur au moins 10 cryptes par souris. (n=5, *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

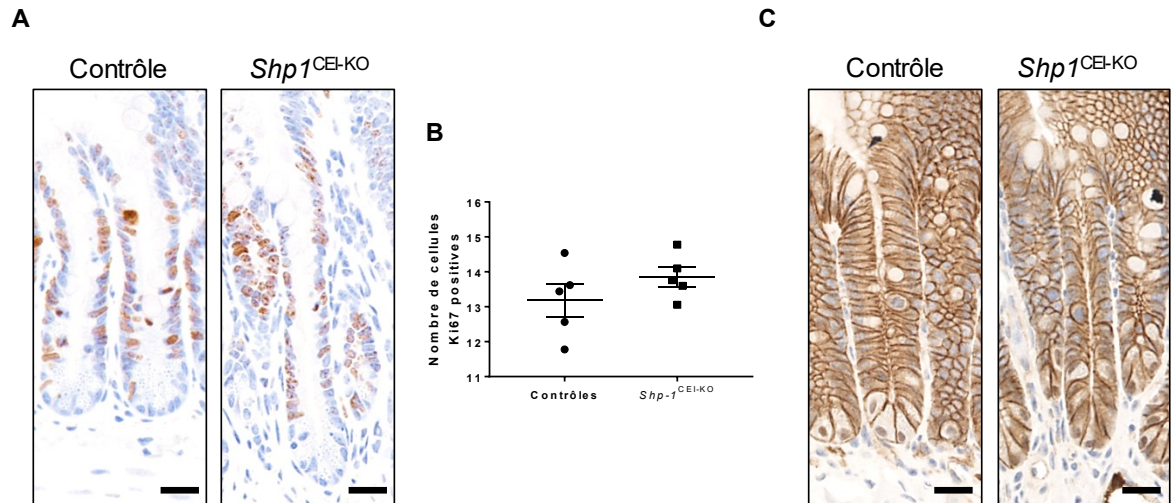


Figure 17. La perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal ne semble plus induire d'hyperprolifération cryptale ou de hausse de la β -caténine nucléaire chez des souris âgées de 15 mois.

A. La prolifération a été évaluée par immunohistochimie contre Ki67 sur des coupes histologiques de jéjunum moyen. Barre de calibration = 20 μ m. **B.** Le nombre de cellules Ki67 positives par crypte a été calculé sur au moins 10 cryptes par souris (n=5). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. **C.** La localisation de la β -caténine a été évaluée par immunohistochimie sur des coupes histologiques de jéjunums de souris âgées de 15 mois. Barre de calibration = 20 μ m.

2.1.4 La perte de SHP1 dans les CEIs des souris $Apc^{Min/+}$ exacerbe la polypose

Nous nous sommes intéressés par la suite au modèle de souris $Apc^{Min/+}$. Ces souris forment spontanément des tumeurs intestinales communément appelées polypes (Moser et al., 1990; Su et al., 1992). Ainsi, nous avons croisé les souris $Apc^{Min/+}$ avec les souris $Shp1^{CEI-KO}$ pour obtenir des souris $Shp1^{CEI-KO};Apc^{Min/+}$. À 3 mois, nous avons dénombré la quantité de polypes présents dans tout l'intestin grêle et dans le côlon. De façon intéressante, une augmentation significative du nombre de polypes présentes dans l'intestin grêle est observée chez les souris $Shp1^{CEI-KO};Apc^{Min/+}$ comparativement aux souris $Apc^{Min/+}$ contrôles (Fig. 18A); aucune différence significative n'a été cependant observée au niveau du côlon (Fig. 18B). De plus, une légère différence au niveau de la taille des polypes intestinaux est observée. En effet, lorsque les polypes sont regroupés selon leur taille, une augmentation significative du nombre de polypes de plus de 2 mm est notée chez les souris $Shp1^{CEI-KO};Apc^{Min/+}$, sans toutefois obtenir de significativité à d'autres tailles (Fig. 18C). Ces

données indiquent donc que la perte d'expression dans les CEIs de SHP1 chez les souris *Apc*^{Min/+} exacerbe la polypose et potentiellement la progression de certains polypes.

Mis ensemble tous ces résultats montrent que SHP1 régule négativement la tumorigénèse intestinale sans toutefois pouvoir être considéré comme un suppresseur de tumeur puisque la perte de son expression ne suffit pas à elle seule à induire la formation de tumeurs. Tout de même, la perte d'expression de SHP1 dans l'épithélium intestinal est capable d'augmenter la polypose induite par la perte d'hétérozygotie de *Apc*, un des principaux gènes suppresseurs de tumeurs dans l'intestin, et d'augmenter le potentiel de croissance en indépendance d'ancrage des cellules cancéreuses.

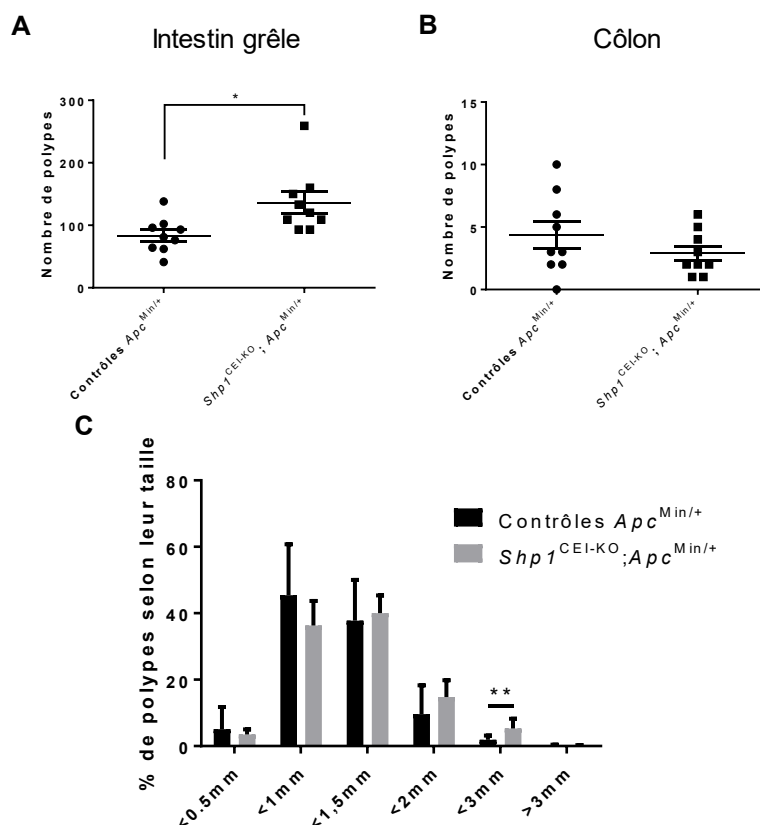


Figure 18. La perte de SHP1 dans les cellules épithéliales intestinales des souris *Apc*^{Min/+} exacerbe le développement de la polypose dans l'intestin grêle.

Les polypes présents dans l'intestin grêle (A) ou dans le côlon (B) ont été dénombrés. C. Les polypes intestinaux ont été classés par taille et représentés en pourcentage de polypes présents dans chacune de ces catégories (n=9, *p<0,05; **p<0,01). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

SECTION 2.2 : L'INFLAMMATION INTESTINALE

Les souris *Motheaten* et *Motheaten viable* expriment chacun une mutation perte-de-fonction de SHP1, et sont grandement connues pour leur phénotype d'inflammation généralisée spontanée (Abram et al., 2013; Green and Shultz, 1975). Aussi, la délétion de SHP2 dans l'épithélium intestinal, une phosphatase qui possède 55% d'homologie de séquence avec SHP1 (Craggs and Kellie, 2001), mène au développement spontané d'une inflammation intestinale de type colite (Coulombe et al., 2013; Yamashita et al., 2014). Ces données de la littérature suggèrent donc que la perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal pourrait potentiellement perturber le maintien de l'homéostasie inflammatoire de l'intestin. Cependant, nous n'avons observé aucun signe d'inflammation intestinale lors des caractérisations histologiques, biochimiques et macroscopiques des souris *Shp1*^{CEI-KO}.

2.2.1 La susceptibilité du côlon au DSS n'est pas modulée par SHP1

Considérant que les souris *Shp1*^{CEI-KO} présentent certaines altérations phénotypiques dans leur intestin grêle, nous avons décidé de vérifier si l'absence de SHP1 altérerait également la sensibilité de l'épithélium intestinal à un stress. Nous avons ajouté dans l'eau de boisson des souris 2,25% de Dextran sulfate de sodium (DSS) et ce, pendant 7 jours. Le DSS est un détergent de haut poids moléculaire capable d'induire l'apoptose des colonocytes (Whittem et al., 2010), ce qui engendre une inflammation colique. Nous avons observé quotidiennement les souris pour évaluer leur état de santé et déterminer leur poids. La figure 18A montre la courbe de poids des souris contrôles et expérimentales par rapport à leur poids initial. Nous pouvons y voir que les souris *Shp1*^{CEI-KO} ont perdu significativement plus de poids que les souris contrôles, ce qui pourrait suggérer que ces souris sont plus sensibles à l'ingestion de DSS. Cependant, lors de l'euthanasie des animaux aucune différence significative de « l'indice de la maladie » n'a été observée (Fig. 19B). L'indice de la maladie prend en compte les signes macroscopiques du développement d'une colite tels que la dureté du côlon, la présence de sang dans les fèces, la dureté des fèces et la présence de saignement rectaux. Afin d'évaluer les dommages à la muqueuse du côlon suivant le traitement au DSS, le score histologique des souris a été aussi évalué à partir de coupes histologiques. Le calcul de ce score est basé sur l'étendue des dommages de la muqueuse, l'infiltration de cellules immunitaires, l'épaississement de la musculature, la présence d'abcès de cryptes et la perte

de cellules caliciformes. Encore une fois, cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les souris contrôles et les souris *Shp1*^{CEI-KO} (Figure 19C-D). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les souris contrôles et les souris expérimentales développent une colite similaire en réponse au DSS.

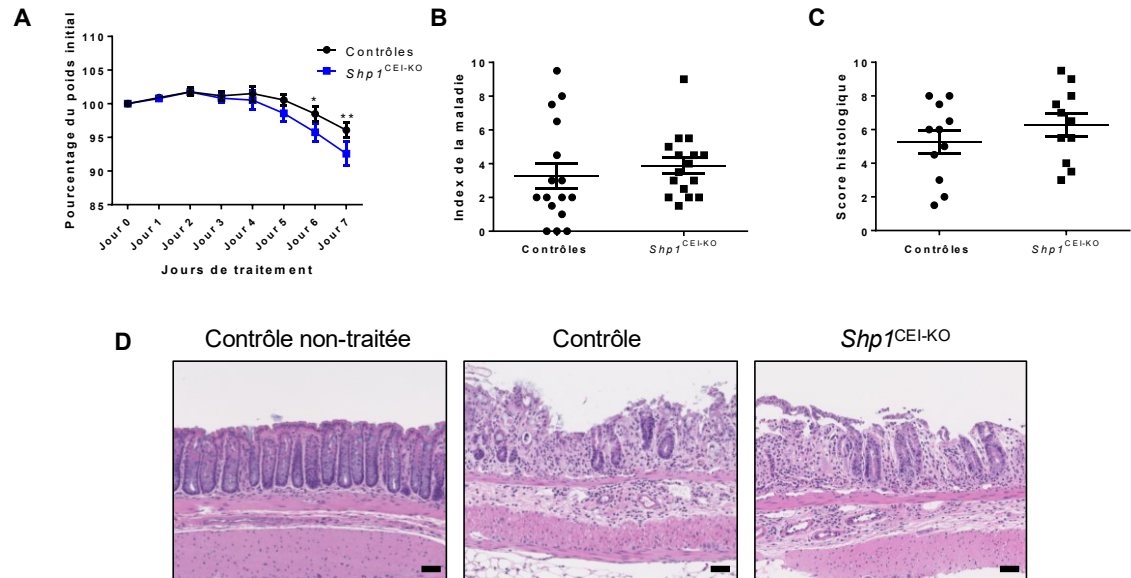


Figure 19. La perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal ne module pas la sensibilité des souris à développer une colite en réponse au DSS.

Les souris *Shp1*^{CEI-KO} et contrôles ont été traitées pendant 7 jours au DSS 2,25% dissout dans leur eau de boisson. **A.** Un suivi quotidien du poids des souris normalisé sur leur poids initial a été fait (n=16, *p<0,05, **p<0,01). **B.** L'index de sévérité de la maladie a été évalué lors de l'euthanasie en fonction de la dureté du côlon, de la dureté des fèces, de la présence de saignements rectaux et de la présence de sang dans les fèces (n=16). **C.** Le score histologique a été évalué à partir des coupes histologiques et basé sur l'étendue des dommages de la muqueuse, l'infiltration de cellules immunitaires, l'épaississement de la musculature, la présence d'abcès de cryptes et la perte de cellules caliciformes (n=16). **D.** Coloration à l'hématoxyline et éosine de coupes histologiques de côlon. Barre de calibration = 50 µm. Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

Considérant l'effet de SHP1 sur la voie Wnt/β-caténine et l'importance de celle-ci sur le renouvellement et la réparation tissulaire (Karin and Clevers, 2016), nous avons pensé que la perte de SHP1 pourrait plutôt affecter la vitesse de régénération de l'épithélium suite à l'exposition au DSS. Pour évaluer ceci, nous avons donc traité des souris contrôles et expérimentales avec du DSS 1,75% pendant 7 jours, puis nous les avons laissé récupérer pendant 14 jours, durant lesquels le DSS a été retiré de l'eau de boisson. Encore une fois,

une courbe de poids relative au poids initial de chaque individu a été établie, où aucune différence entre le poids des souris contrôles et expérimentales n'a été observée (Fig. 20A). L'évaluation de l'index de maladie et l'analyse histologique n'ont pas non plus montré de différences dans la récupération des souris contrôles et *Shp1*^{CEI-KO} suite à un stress au DSS (Fig. 20B-D).

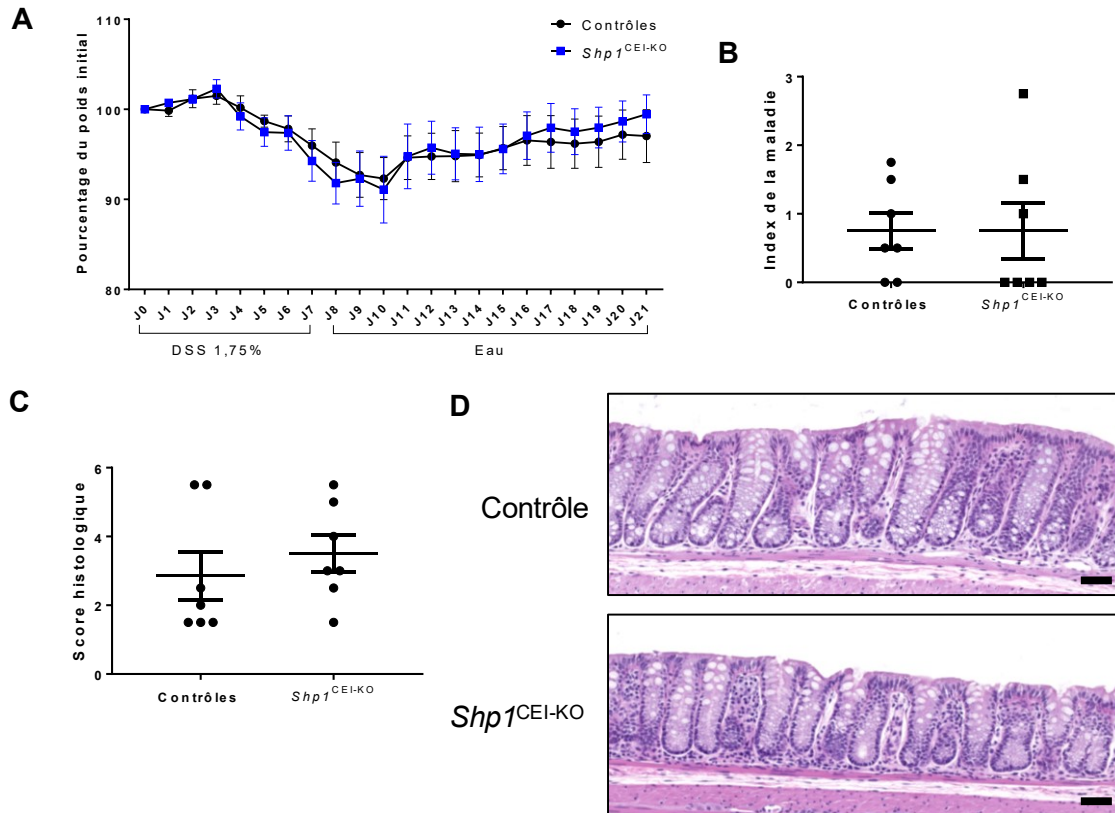


Figure 20. La perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal n'affecte pas la récupération des souris suite à un traitement au DSS.

Les souris ont été traitées au DSS 1,75% dissout dans l'eau de boisson pendant 7 jours, suivi d'une période de récupération de 14 jours. **A.** Un suivi quotidien du poids des souris normalisé sur leur poids initial a été fait (n=7). **B.** L'index de sévérité de la maladie a été évalué lors de l'euthanasie en fonction de la dureté du côlon, de la dureté des fèces, de la présence de saignements rectaux et de la présence de sang dans les fèces (n=7). **C.** Le score histologique a été évalué à partir des coupes histologiques et basé sur l'étendue des dommages de la muqueuse, l'infiltration de cellules immunitaires, l'épaississement de la musculature, la présence d'abcès de cryptes et la perte de cellules caliciformes (n=7). **D.** Coloration à l'hématoxyline et éosine de coupes histologiques de côlon. Barre de calibration = 50µm. Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

2.2.2 Absence totale de phénotype dans le côlon des souris *Shp1*^{CEI-KO}

Afin de mieux comprendre pourquoi les souris *Shp1*^{CEI-KO} perdent plus de poids suivant un traitement au DSS sans présenter de différence quant à la gravité des dommages induits à la muqueuse du côlon, nous avons d'abord analysé, plus en détail, le phénotype du côlon des souris *Shp1*^{CEI-KO}. Tel que mentionné plus tôt, la principale caractéristique de l'intestin grêle des souris *Shp1*^{CEI-KO} est l'intestinalomégalie qui se développe et qui est maintenue même avec l'âge (Leblanc et al., 2017) (Fig. 16A-C). Lorsque le poids et la longueur du côlon des souris contrôles sont comparés à ceux des souris expérimentales, aucune différence significative n'est observée, ce qui indique que l'intestinalomégalie des souris *Shp1*^{CEI-KO} est restreinte à l'intestin grêle (Fig. 21A-B). De la même façon, aucune modulation de la hauteur des cryptes coliques (Fig. 21C-D) ou de la prolifération évaluée par une immunohistochimie contre Ki67 n'ont été notées dans le côlon des souris expérimentales (Fig. 21E-F). Ces résultats indiquent donc qu'effectivement, les souris *Shp1*^{CEI-KO} ne présentent aucun phénotype particulier au niveau du côlon.

Pour mieux comprendre l'absence de phénotype dans le côlon de nos souris expérimentales, nous avons d'abord questionné l'efficacité du système Cre-loxP à induire la délétion de SHP1 dans le côlon. Cependant, des analyses qPCR montrent que l'expression de *Ptpn6* est autant diminuée dans le jéjunum que dans le côlon, ce qui invalide cette hypothèse (Fig. 22A). L'idée d'une compensation par l'expression de SHP2, dont la l'invalidation affecte plus fortement le côlon que l'intestin grêle (Coulombe et al., 2013), a donc été soulevée, mais encore une fois, aucune différence d'expression de *Ptpn11* (gène encodant SHP2) n'a été observée, ni dans le jéjunum, ni dans le côlon (Fig. 22B). De la même façon, aucune différence n'a été notée quant à l'expression protéique de SHP2 dans le côlon entre les souris contrôles et *Shp1*^{CEI-KO} (Fig. 22C). Notre dernière hypothèse pour tenter d'expliquer l'absence de phénotype dans le côlon de nos souris expérimentales s'intéresse plus particulièrement à l'activation de SHP1. En effet, en condition basale, SHP1 se retrouve sous une forme repliée inactive (Wang et al., 2011; Yang et al., 2003). Nous avons donc suggéré que cette phosphatase pourrait potentiellement être normalement moins active dans le côlon, ce qui n'engendrerait pas d'effet si elle venait à ne plus y être exprimée. Nous nous sommes donc intéressés à la phosphorylation sur la sérine 591 de SHP1 qui a déjà

été montrée par notre laboratoire pour être impliquée dans la protéolyse de SHP1 (Simoneau et al., 2008), et qui est connue pour inhiber l'activité de SHP1 et restreindre sa localisation au cytoplasme (Liu et al., 2007). De façon intéressante, nous avons effectivement observé par immunobuvardage qu'il y avait une augmentation de la phosphorylation de SHP1 sur sa sérine 591 dans le côlon de souris contrôles en comparaison avec le jéjunum (Fig. 22D).

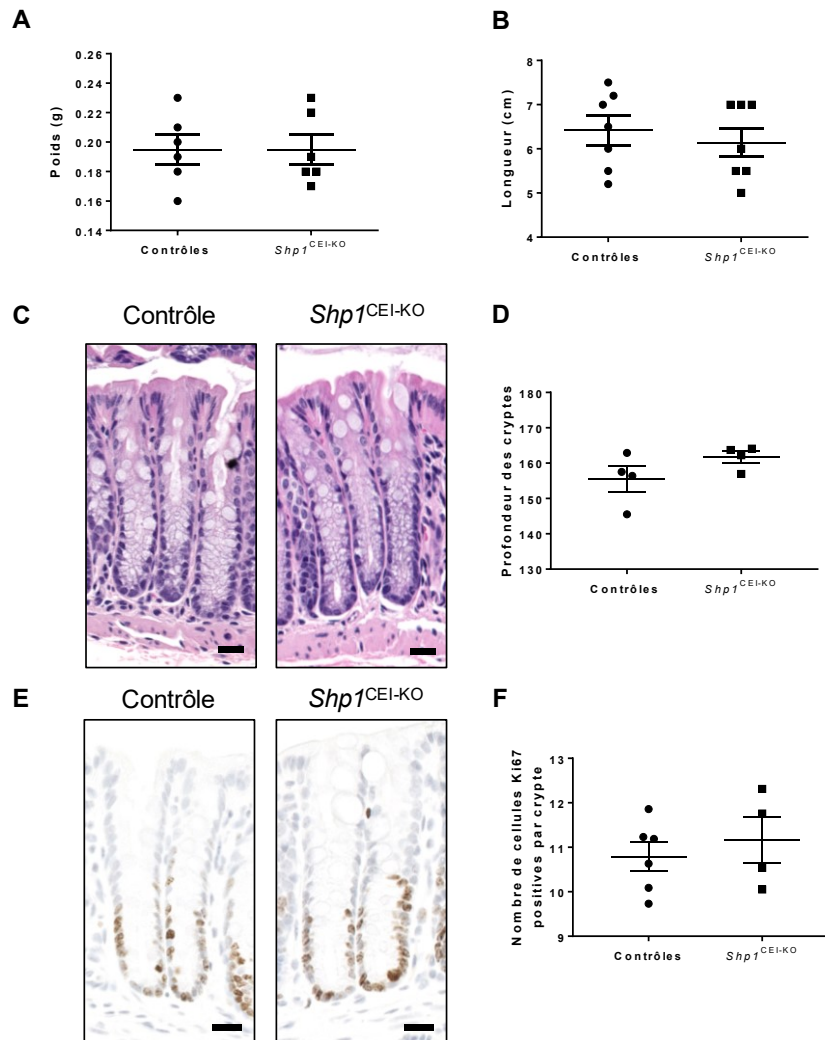


Figure 21. La perte d'expression de SHP1 n'altère pas le phénotype colique des souris âgées de 6 semaines.

A. Le poids du côlon des souris contrôles et expérimentales a été mesuré (n=6). **B.** La longueur du côlon des souris a été mesurée (n=7). **C.** Coloration hématoxyline et éosine de cryptes de côlon distal. Barre de calibration = 20 μm. **D.** La hauteur des cryptes de côlon distal a été mesurée sur au moins 17 cryptes par souris (n=4). **E.** Immunohistochimie contre Ki67 sur des coupes de côlon distal. Barre de calibration = 20 μm. **F.** Le décompte du nombre de cellules Ki67 positives par crypte a été fait sur au moins 13 cryptes par souris (n≥4). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

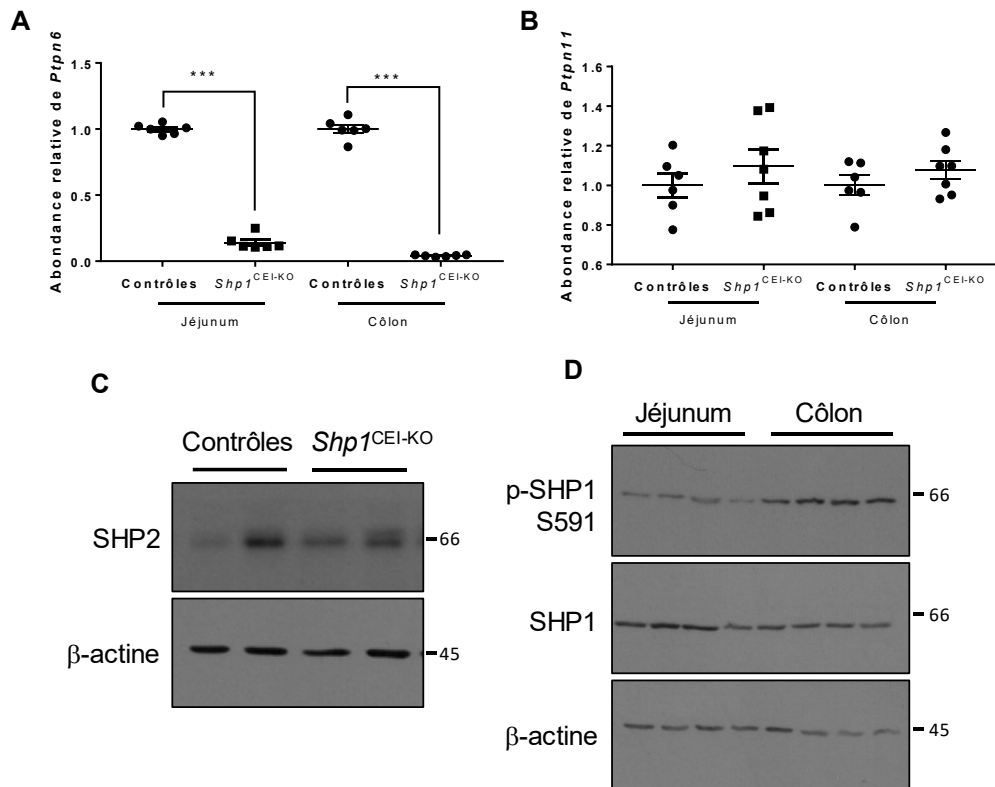


Figure 22. Expression de SHP1 et de SHP2 dans l'intestin grêle et le côlon des souris *Shp1*^{CEI-KO}.

A. L'expression relative de *Ptpn6* a été évaluée sur des extraits d'enrichissements d'épithéliums de jéjunums ou de côlon (n=6, ***p≤0,001). **B.** L'expression relative de *Ptpn11* a été évaluée sur des extraits d'enrichissements d'épithéliums de jéjunums ou de côlon (n=6). L'abondance relative a été normalisée sur les gènes *Txn14b*, *Pum1* et *Tbp*. Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne. **C.** Immunobuvardage contre SHP2 sur des extraits d'enrichissement d'épithéliums de côlons de souris de 6 sem. **D.** Immunobuvardage contre SHP1 et sa phosphorylation sur la sérine 591 sur des enrichissements d'épithéliums de jéjunums et de côlons de souris contrôles. L'actine a servi de contrôle de charge.

2.2.3 L'iléon des souris *Shp1*^{CEI-KO} est plus susceptible au DSS

Puisque les souris *Shp1*^{CEI-KO} ne présentent aucune altération phénotypique apparente dans leur côlon, il n'est pas si étonnant qu'elles développent une colite similaire aux souris contrôles en réponse au DSS. Cependant, suivant un traitement aigu de 2,25% DSS, les souris expérimentales ont tout de même démontré une réduction significative de poids (Fig. 19A). Très peu d'évidences existent dans la littérature concernant les effets du DSS dans l'intestin

grêle. Nous avons tout de même analysé le phénotype de l'iléon distal chez nos souris contrôles et expérimentales traitées au DSS 2,25%. Contre toute attente, nous avons pu observer certains dommages à l'épithélium chez les souris traitées au DSS (Fig. 23A). Parmi les rares publications sur l'effet du DSS dans l'intestin grêle, certaines équipes ont rapporté un changement dans la hauteur des villosités comme signe de dommage (Chen et al., 2015; Menconi et al., 2015). Nous avons donc évalué la longueur des villosités de l'iléon de nos souris contrôles et expérimentales, traitées ou non au DSS. Nous avons ainsi pu constater que suite au traitement au DSS, la hauteur des villosités était significativement diminuée et ce, tant chez les souris contrôles que les *Shp1*^{CEI-KO} (Fig. 23B). De plus, en comparant les souris contrôles et les souris *Shp1*^{CEI-KO} traitées au DSS, une réduction significative est observée, suggérant que les souris invalidées pour SHP1 seraient plus affectées par le DSS que les souris contrôles (Fig. 23B, colonnes 3 vs 4). Pour confirmer cette observation, nous avons voulu évaluer l'inflammation présente dans l'iléon. Puisque le score histologique normalement utilisé est adapté au côlon, nous nous sommes seulement concentrés à évaluer les dommages à l'épithélium, classés sur une échelle de 1 à 10, en fonction de l'étendue des dommages. Ainsi, nous avons noté une augmentation significative des dommages présents dans l'iléon des souris *Shp1*^{CEI-KO} traitées au DSS, comparativement aux souris contrôles, également traitées au DSS (Fig. 23C).

Les données de la littérature suggéraient que l'absence de SHP1 pourrait sensibiliser à l'inflammation intestinale. Ça semble effectivement le cas, mais seulement au niveau de l'intestin grêle, car la perte de SHP1 ne semble pas du tout affecter l'homéostasie du côlon. Cependant, puisqu'il affecte principalement le côlon, le traitement au DSS n'est pas un modèle approprié pour bien analyser le rôle de SHP1 dans l'inflammation intestinale.

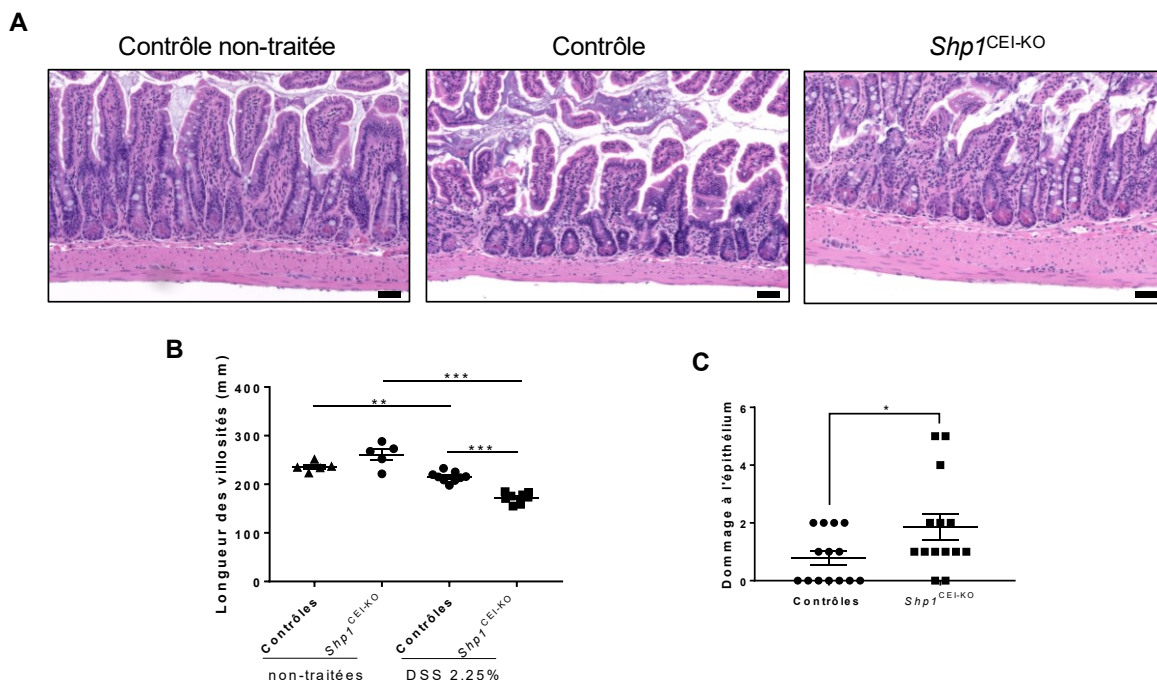


Figure 23. L'iléon des souris *Shp1*^{CEI-KO} est plus susceptible aux dommages induits par le DSS.

Les souris ont été traitées au DSS 2,25% dissout dans l'eau de boisson pendant 7 jours. **A.** Coloration à l'hématoxyline et éosine de coupes histologiques d'iléon distal. Barre de calibration = 50 μ m. **B.** Mesure de la hauteur des villosités des souris contrôles et expérimentales avec ou sans traitement au DSS 2,25%. Au moins 17 villosités ont été mesurées par souris ($n \geq 5$). **C.** Le dommage à l'épithélium a été évalué à partir de coupes histologiques selon l'étendue et la gravité des dommages de la muqueuse ($n=14$).

Chapitre 3 : Régulation de SHP1

Peu de chose est connu quant à la régulation de l'expression de SHP1. Nous avons déjà observé que l'expression des transcrits de SHP1 était diminuée dans les tumeurs colorectales (Fig. 13B). Nous avons donc décidé d'analyser un peu plus en détail comment était régulé le niveau d'expression protéique de SHP1 dans les cellules tumorales intestinales et cancéreuses colorectales.

3.1 Modulation de l'expression protéique de SHP1 dans le cancer colorectal

Nous avons d'abord évalué l'expression protéique de SHP1 dans des tumeurs colorectales paires provenant de notre biobanque locale. De manière surprenante, nous

avons observé par immunobuvardage que l'expression de SHP1 est significativement augmentée dans la majorité des tumeurs colorectales analysées comparativement à leur marge saine pairée et ce, tous stades confondus (Fig. 24A-B). Puisque les tumeurs colorectales ne sont pas uniquement constituées d'épithélium, mais entre autres de cellules stromales, immunitaires et endothéliales dans lesquelles SHP1 est très fortement exprimée, nous nous sommes tournés vers un modèle plus simple pour l'analyse de son expression : les lignées cellulaires colorectales. Nous avons à nouveau évalué par immunobuvardage l'expression de SHP1 dans différentes lignées, soit une lignée normale et 7 lignées cancéreuses. Encore une fois, nous avons noté une augmentation importante de l'expression protéique de SHP1 dans les cellules cancéreuses colorectales lorsque comparées avec la lignée colorectale normale, soit les CRL1790 (Fig. 24C). De façon très intéressante, cependant, nous avons noté qu'une des lignées cancéreuses, la lignée RKO, exprime elle aussi très faiblement SHP1. Lorsque les lignées cellulaires analysées sont regroupées en fonction de leurs mutations dans les effecteurs de la voie Wnt/ β -caténine, nous observons un patron très intéressant où les cellules qui possèdent une mutation activatrice de la voie Wnt/ β -caténine (*APC* ou *CTNNB1*) présentent de plus forts niveaux d'expression de SHP1 comparativement aux cellules normales (CRL1790) ou cancéreuses dépourvues de mutations dans les gènes *APC* ou *CTNNB1* (Fig. 24C). Évidemment, lorsque la voie Wnt/ β -caténine est hyperactivée par la présence de la mutation *APC* ou *CTNNB1*, un niveau plus élevé de la protéine β -caténine est observée (probablement attribuable à sa stabilisation). Une corrélation positive et significative est d'ailleurs observée entre l'expression protéique de SHP1 et de la β -caténine dans les lignées cellulaires analysées (Fig. 24D).

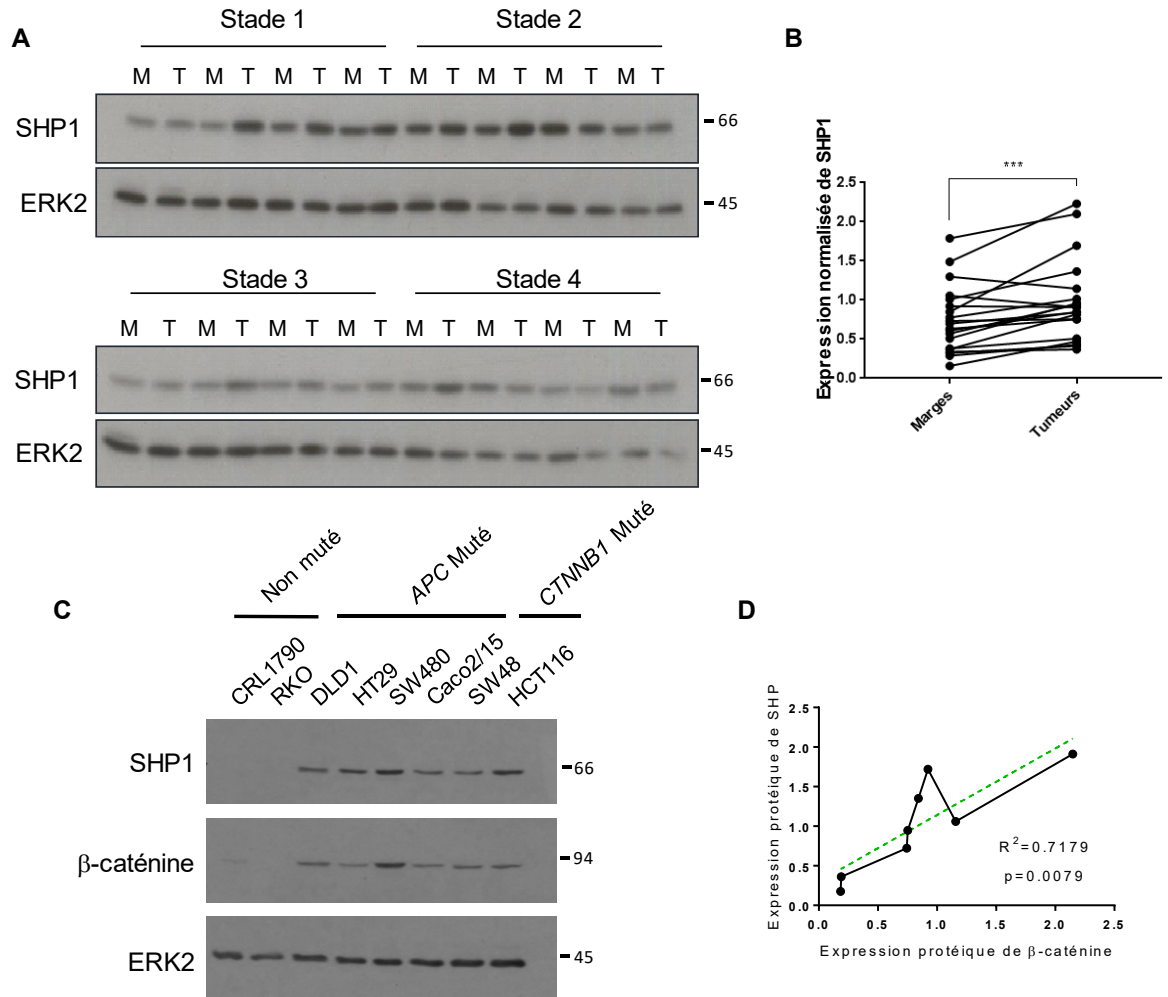


Figure 24. L'expression protéique de SHP1 est augmentée dans les tumeurs colorectales.

A. L'expression de SHP1 a été évaluée par immunobuvardage dans des marges de résections saines (M) en comparaison avec leurs tumeurs colorectales paires (T) de différents stades. ERK2 a servi de contrôle de charge. **B.** L'expression de SHP1 a été normalisée sur ERK2, puis comparée entre chaque tumeur colorectale et leur marges saines paires. (n=16, ***p≤0,001). **C.** L'expression de SHP1 dans les différentes lignées colorectales, normale ou cancéreuses, a été évaluée par immunobuvardage, de même que l'expression de la β-caténine. ERK2 a servi de contrôle de charge. **D.** Corrélation linéaire entre l'expression protéique de SHP1 et celle de la β-caténine dans les lignées colorectales. Le graphique représente la moyenne de trois expériences indépendantes.

3.2 L'expression protéique de SHP1 dans les adénomes des souris *Apc*^{Min/+}

Ces derniers résultats suggèrent que l'expression protéique de SHP1 pourrait dépendre de l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Afin de vérifier cela, nous nous sommes intéressés au modèle de souris *Apc*^{Min/+} qui forment spontanément des tumeurs bénignes suivant une mutation dans le gène *Apc*, ce qui mène à une hausse protéique de la β -caténine et à l'hyperactivation de la signalisation en aval. Toujours par immunobuvardage, nous avons noté que dans les polypes de souris *Apc*^{Min/+}, l'expression de SHP1 y est plus forte que dans la marge saine adjacente, ce qui corrèle encore une fois avec l'expression protéique de la β -caténine (Fig. 25A). De façon très intéressante, lorsque le ratio d'expression protéique de la β -caténine d'un polype sur sa marge est mis en relation avec le même ratio d'expression de SHP1, deux groupes distincts sont obtenus (Fig. 25B). En effet, les polypes qui présentent une expression similaire de la β -caténine entre le polype et sa marge (ratio ≈ 1) vont également avoir une expression similaire de SHP1 entre la marge et le polype, voire réduite (Fig. 25B, cercle bleu). Cependant, les polypes qui ont une plus grande expression de la β -caténine dans le polype par rapport à la marge (ratio ≥ 1) vont pour la plupart aussi avoir une augmentation de l'expression protéique de SHP1 dans le polype par rapport à la marge (Fig. 25B, cercle vert). Par immunofluorescence, nous avons aussi observé que l'expression protéique de la β -caténine était beaucoup plus forte dans le polype que dans l'épithélium sain adjacent (Fig. 25C, panneaux du centre). De la même façon, l'expression de SHP1 est elle aussi plus importante dans le polype que dans le tissu normal adjacent (Fig. 25C, panneaux de droite, flèches). De manière intéressante, même en immunofluorescence il semble y avoir une corrélation entre les zones où la β -caténine est plus fortement exprimée et où SHP1 l'est tout autant (Fig. 25C, flèches).

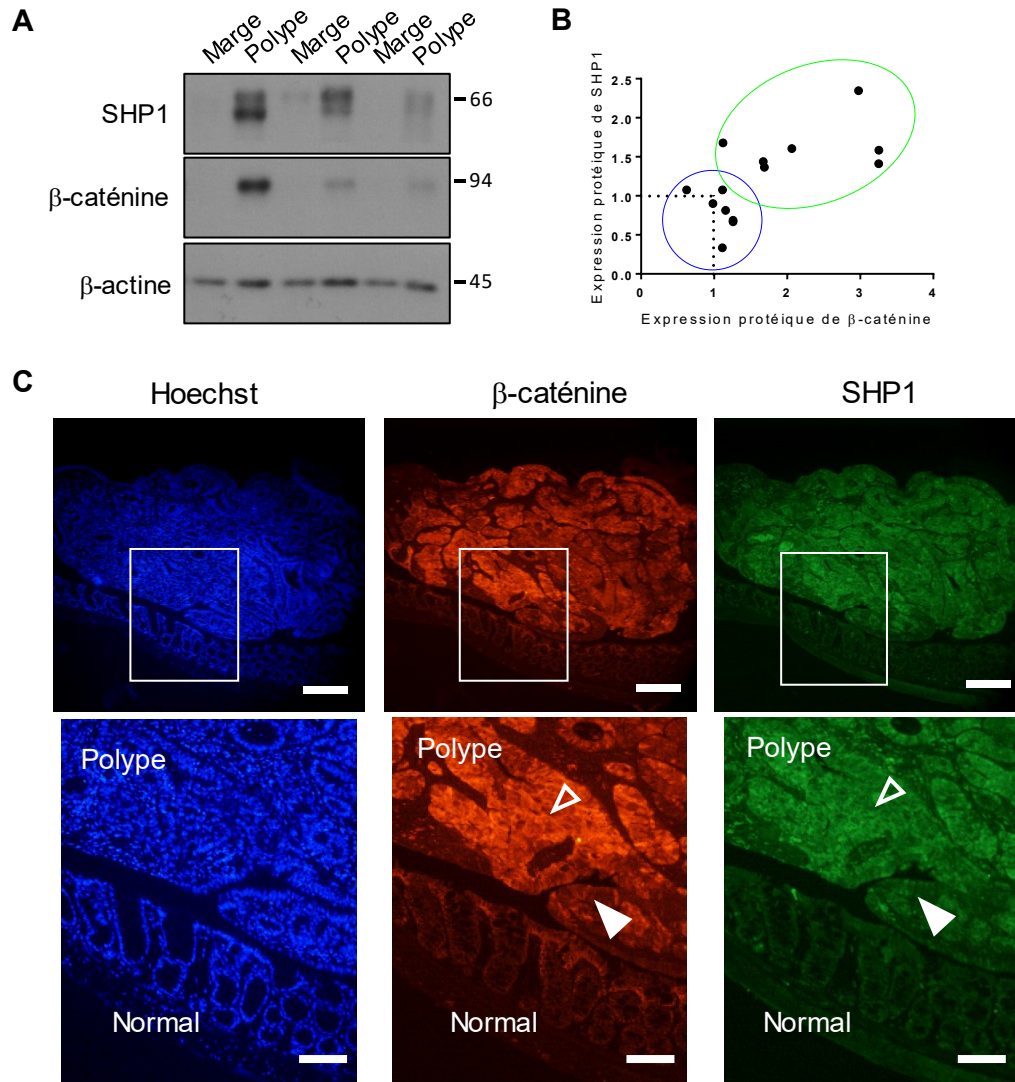


Figure 25. L'expression protéique de SHP1 et de la β-caténine est augmentée dans les polypes de souris $Apc^{Min/+}$.

A. L'expression de SHP1 et de la β-caténine a été évaluée dans des polypes de souris $Apc^{Min/+}$ pairées à leur marge normale. L'actine a servi de contrôle de charge. **B.** Le ratio d'expression de la β-caténine dans un polype sur son expression dans la marge pairée adjacente a été mis en relation avec le ratio d'expression de SHP1 dans le même polype sur son expression de la marge pairée. Les deux cercles délimitent deux populations de polypes différents en fonction de leur intensité d'expression de la β-caténine et de SHP1. **C.** L'expression de la β-caténine et de SHP1 a été évaluée par une immunofluorescence faite sur des coupes histologiques de polypes de souris $Apc^{Min/+}$ bordés par de l'épithélium normal. L'Hoechst permet de visualiser le noyau de toutes les cellules. Une flèche vide indique où l'expression de la β-caténine est forte, une flèche pleine indique où l'expression de la β-caténine est plus faible. Barre de calibration = 100 μm (panneaux du haut), = 50 μm (panneaux du bas).

3.3 Régulation de SHP1 en fonction de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine

Ces observations ont été faites dans des cellules qui ont une hyperactivation endogène de la signalisation Wnt/ β -caténine due à des mutations dans les gènes *CTNNB1* et *APC*. Pour s'affranchir de ce biais, nous avons généré un modèle de surexpression exogène de la β -caténine dans des cellules qui n'ont pas de mutations activatrices de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Ainsi, nous avons utilisé des cellules 293T qui ont une grande capacité à être transfectées. De façon très surprenante, la transfection seule de la β -caténine dans ces cellules est suffisante pour induire une hausse importante d'expression protéique de SHP1 (Fig. 26A). Afin de déterminer si la régulation passait par une augmentation de la transcription du gène *PTPN6*, des analyses qPCR ont été réalisées. Bien que l'expression de *AXINE2* ait été légèrement mais significativement augmentée par la surexpression de la β -caténine, aucune modulation significative de l'expression de *PTPN6* n'a été observée (Fig. 26B), suggérant que la régulation de l'expression protéique de SHP1 ne passerait pas nécessairement par la régulation de sa transcription.

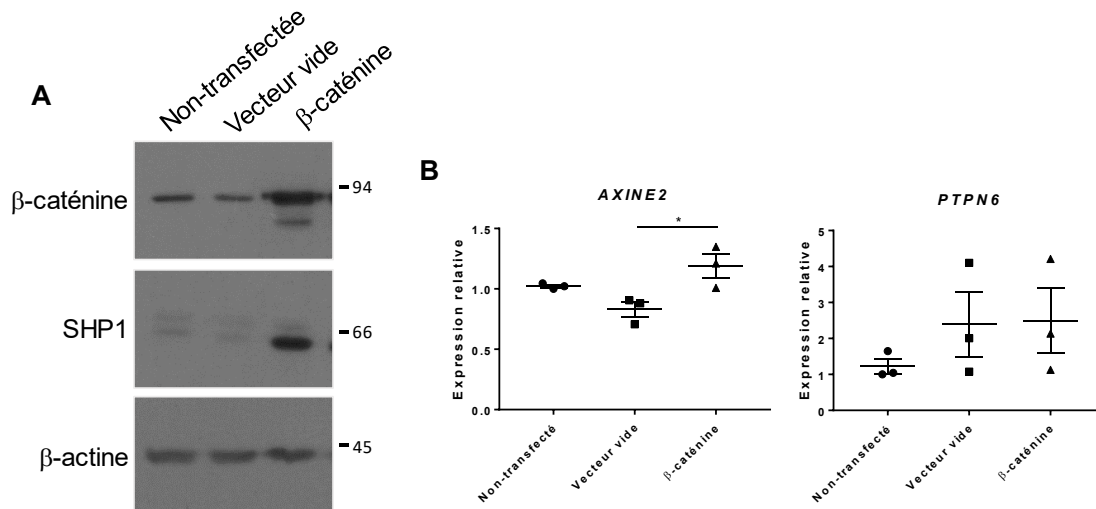


Figure 26. Régulation de l'expression protéique de SHP1 dans un modèle d'expression ectopique de la β -caténine.

Des cellules 293T ont été transfectées avec un vecteur vide ou exprimant la β -caténine. **A.** L'expression de SHP1 et de la β -caténine a été évaluée par immunobuvardage. L'actine a servi de contrôle de charge. **B.** L'expression relative de *AXINE2* et de *PTPN6* a été évaluée par qPCR. L'abondance relative a été normalisée sur les gènes *FLT3LG*, *MRPL19* et *PUM1* (* $p \leq 0,05$). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne.

3.4 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de SHP1

Un résultat préliminaire nous suggère que la stabilité de la protéine SHP1 serait affectée par l'expression de la β -caténine. En effet, suivant un traitement à la cycloheximide, la demi-vie de SHP1 peut être évaluée, et lorsque la β -caténine est co-exprimée dans des cellules 293T avec SHP1, nous semblons observer que SHP1 serait stabilisée (Annexe 1). De plus, puisque la forte augmentation d'expression de SHP1 ne semble pas due à un effet transcriptionnel, nous nous sommes intéressés à la dégradation de SHP1. Très peu de choses sont connues à ce sujet, sinon que SHP1 pourrait être dégradé par le protéasome suivant une phosphorylation sur sa sérine 591 (Simoneau et al., 2008). Nous nous sommes donc intéressés à l'ubiquitination de SHP1 afin de déterminer si l'expression protéique de la β -caténine pouvait influencer la dégradation protéasomale de SHP1. Des cellules 293T ont donc été co-transfectées avec une construction de SHP1 et d'ubiquitine étiquetée HA, ou avec SHP1, la β -caténine et l'ubiquitine-HA. Quarante-huit heures suivant la transfection, les cellules ont été lysées, puis une immunoprécipitation contre SHP1 a été faite. Par immunobuvardage, la quantité d'ubiquitine liée à SHP1 a été évaluée par la détection de l'étiquette HA. Ainsi, nous avons observé que pour une quantité égale d'ubiquitine détectée dans les lysats totaux, une réduction importante de l'ubiquitination de SHP1 est notée lorsque la β -caténine est co-exprimée avec elle (Fig. 27A). Ce résultat suggère donc que SHP1 serait moins ubiquitiné lorsque la β -caténine est fortement exprimée. Considérant le très faible niveau d'ubiquitination observé lorsque SHP1 et β -caténine sont co-transfectés, nous avons spéculé que la surexpression de la β -caténine inhiberait le recrutement d'une E3 ubiquitine ligase qui prendrait normalement en charge SHP1. Nous nous sommes d'abord intéressés à la E3 ubiquitine ligase β -TrCP, fortement impliquée non seulement dans la dégradation de la β -caténine mais également de bien d'autres protéines (Frescas and Pagano, 2008). En effet, nous avons spéculé que la surexpression de la β -caténine pouvait peut-être saturer son propre système de dégradation impliquant cette E3 ligase, provoquant donc l'accumulation de ses différents substrats dont peut-être SHP1. Cependant, le motif reconnu par β -TrCP sur ses substrats (DpSGxxpS) n'est pas retrouvé au sein de SHP1, éliminant ainsi cette E3 ubiquitine ligase spécifiquement. Ensuite, nous nous sommes intéressés à c-CBL, une E3 ubiquitine ligase qui est aussi activée par la voie Wnt/ β -caténine (Chitalia et al., 2013; Shivanna et al.,

2015). Le phosphodégéron de cette E3 ubiquitine ligase étant moins bien défini, nous avons utilisé une approche d'ARN d'interférence ciblant spécifiquement *CBL* (siCBL). Nous avons donc transfecté des 293T avec trois siARN différents, et malgré leur bonne efficacité pour diminuer l'expression de c-CBL, l'expression de SHP1 demeure inchangée (Fig. 27B). Ce résultat nous indique donc que ça ne serait pas non plus cette E3 ubiquitine ligase qui serait responsable de la dégradation de SHP1. De façon intéressante, trois E3 ubiquitine ligases ont été identifiées dans notre analyse de spectrométrie de masse : UBE2O, BRCA1 et 2 des sous-unités du complexe APC/C ou cyclosome, ANAPC1 et ANAPC7. Leur rôle potentiel dans la dégradation de SHP1 reste cependant à être étudié.

Ces récents résultats suggèrent donc que l'expression de la β -caténine contrôlerait la dégradation protéasomale de la protéine SHP1 puisque son niveau d'ubiquitination est moindre lorsque la β -caténine est surexprimée. Cependant, le mécanisme moléculaire précis par lequel la phosphatase SHP1 augmente en expression lorsque la β -caténine est abondante demeure encore à être élucidé.

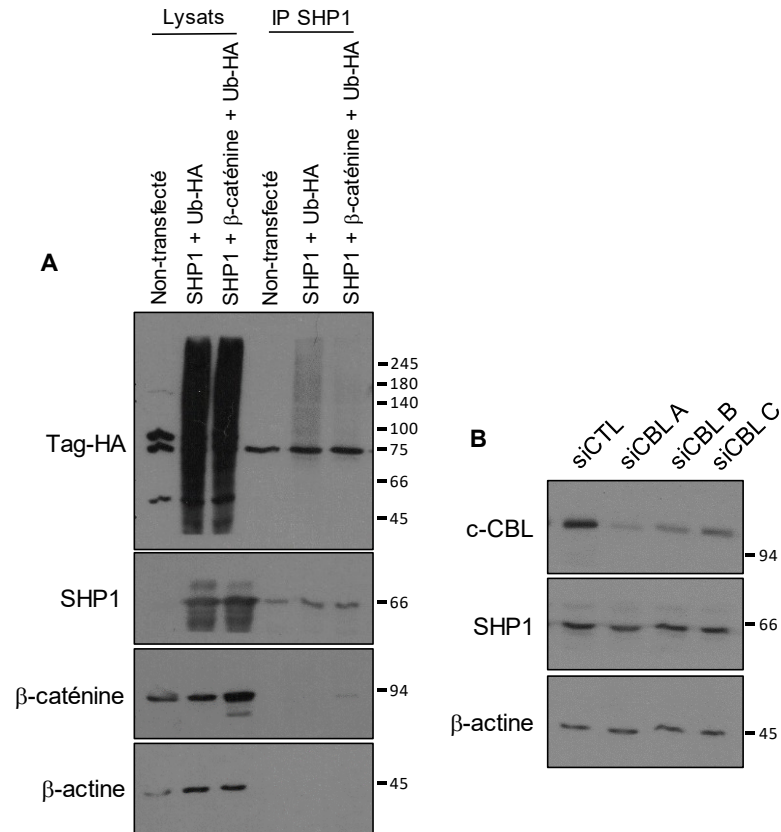


Figure 27. L'ubiquitination de SHP1 est diminuée par la surexpression de la β-caténine.

A. Des cellules 293T ont été transfectées avec des plasmides exprimant SHP1 et l'ubiquitine étiquetée avec l'épitope HA (Ub-HA), ou avec des plasmides exprimant SHP1, la β-caténine et Ub-HA. Une immunoprécipitation contre SHP1 a ensuite été réalisée. L'ubiquitine (HA) a été détectée par immunobuvardage, de même que les niveaux totaux de SHP1 et de β-caténine. L'actine a servi de contrôle de charge pour les lysats totaux. Figure représentative de 3 expériences indépendantes. **B.** Des cellules 293T ont été transfectées avec un siARN contrôle (siCTL) ou 3 différents siARNs ciblant CBL (siCBL A, B et C). L'expression de c-CBL et de SHP1 a été observée par immunobuvardage. L'actine a servi de contrôle de charge.

IV. DISCUSSION

La tyrosine phosphatase SHP1 est largement reconnue dans les cellules d'origine hématopoïétique pour être un régulateur négatif de plusieurs voies de signalisation (Croker et al., 2011; Cyster and Goodnow, 1995; Han et al., 2006b; Kashiwada et al., 2001; Khalil et al., 2012; Kim et al., 1999; Leblanc et al., 2017). Ainsi, SHP1 peut réguler plusieurs processus cellulaires dont la prolifération, l'activation de cellules immunitaires, la différenciation, la migration, l'adhésion, etc. (Abram et al., 2013; Leblanc et al., 2017). Tout déséquilibre dans l'expression ou l'activité de cette phosphatase est alors propice au déséquilibre de l'homéostasie et au développement de différentes pathologies. Bien que SHP1 soit exprimé dans différents épithéliums comme l'épithélium intestinal, son rôle y est bien beaucoup moins caractérisé. Nous nous sommes donc intéressés à évaluer le rôle de SHP1 sur le maintien de l'homéostasie intestinale, mais également son implication potentielle dans le développement du cancer colorectal et de l'inflammation intestinale.

SECTION 1 : SHP1 RÉGULE LA CROISSANCE CELLULAIRE ET LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Des études antérieures réalisées par notre laboratoire ont montré chez la souris que la perte d'expression de SHP1 dans les cellules épithéliales intestinales mène à une hyperactivation de la signalisation PI3K/AKT/mTOR (Leblanc, 2015). De plus, nous avons aussi montré que l'activation de ce sentier de signalisation mène à une augmentation de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 (rpS6), présente dans la sous-unité 40S des ribosomes, et qui est connue pour être impliquée dans le contrôle de la taille cellulaire (Ruvinsky et al., 2005). Ces résultats suggèrent que l'hyperactivation de cette signalisation pourrait être responsable de l'hypertrophie cellulaire et l'intestinalomégalie observées chez les souris invalidées pour SHP1 dans les CEIs (Leblanc, 2015; Leblanc et al., 2017).

Afin de mieux comprendre comment la perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal peut mener à une hypertrophie cellulaire, nous avons inhibé l'expression de SHP1 dans lignées colorectales à l'aide de shARN. De manière intéressante, tant dans les HCT116 que dans les HT29, une augmentation de la taille des cellules est observée lorsque l'expression

de SHP1 est inhibée en comparaison avec les populations contrôles (Fig. 5B-C). De plus, nous avons validé par immunobuvardage que la phosphorylation des sérines 235/236 de la rpS6 est également plus élevée dans les cellules sous-exprimant SHP1 en comparaison aux populations contrôles et aux cellules non infectées (NI) (Fig. 7A). Ainsi, en confirmant l'hypertrophie cellulaire et la phosphorylation de la rpS6, nous avons validé que nos modèles cellulaires reproduisaient les observations faites chez la souris, ce qui en fait un modèle valable pour étudier la mécanistique associée à l'hypertrophie cellulaire et la perte de SHP1.

Comme mentionné plus tôt, la rpS6 est connue pour être impliquée dans la régulation de la taille cellulaire. Plus spécifiquement, il a été montré que cette protéine ribosomale pouvait aussi être impliquée dans la régulation de la traduction. Dans le cas présent, le fait que la phosphorylation de la rpS6 est augmentée, mais que l'expression totale de la protéine soit inchangée indique que la perte de SHP1 n'entraîne pas une augmentation du nombre de ribosomes, mais plutôt une augmentation de leur activité. Ceci corrèle également avec le fait que des changements dans la taille cellulaire vont souvent provenir de changements dans la synthèse protéique (Cai et al., 2016; Damas et al., 2016; Ruvinsky et al., 2005). Nous nous sommes donc intéressés à une autre protéine, soit le facteur d'élongation eEF2. Cette protéine est, elle aussi, activée par la S6K. En effet, eEF2 est inhibée par phosphorylation sur sa thréonine 56 par la eEF2K, qui elle-même est inhibée par phosphorylation par la S6K (Browne and Proud, 2004; Deng et al., 2017). Ainsi, l'activation de la S6K mène à l'activation de eEF2, favorisant l'élongation des peptides durant la traduction. Nous avons alors évalué la phosphorylation de ce facteur d'élongation, et nous avons observé que la phosphorylation de la eEF2 sur sa thréonine 56 est diminuée dans les cellules HCT116 et HT29 sous-exprimant SHP1, en comparaison aux populations contrôles. Ces résultats nous montrent donc que la perte de SHP1 dans des cellules cancéreuses colorectales entraîne une hyperactivation des signalisations S6K/S6 et S6K/eEF2K/eEF2, suggérant une augmentation de la synthèse protéique. Pour valider ceci, nous sommes alors tournés vers la technique SUNSET qui permet d'évaluer le taux de synthèse protéique pendant un intervalle de temps. Cette technique consiste à incuber les cellules en culture avec de la puromycine. Cet antibiotique a pour mécanisme d'action de se lier aux peptides naissants lors de la traduction et de terminer l'élongation des peptides. Ainsi, il est possible d'évaluer le taux de synthèse protéique en évaluant par immunobuvardage la quantité de puromycine détectée, qui reflète

directement tous les peptides en cours de synthèse sur une période donnée. Ainsi, nous avons pu observer que suivant une réduction d'expression de SHP1, la quantité de puromycine détectée après 1 h est plus importante que dans les populations contrôles, tant dans les HCT116 que dans les HT29 (Fig. 7C). Ce résultat indique donc que la quantité de peptides en cours de traduction était plus importante dans la condition sous-exprimant SHP1, et que l'hypertrophie cellulaire observée pourrait provenir d'une augmentation de la synthèse protéique.

Puisque *in vivo* la signalisation PI3K/AKT est hyperactivée lorsque SHP1 est invalidé dans l'épithélium intestinal (Leblanc, 2015), et que cela se répercute sur la rpS6, nous avons voulu par la suite confirmer que l'effet observé de SHP1 sur la phosphorylation du facteur d'élongation eEF2 et l'effet sur la synthèse protéique était également retrouvé chez la souris. Ainsi, par immunobuvardage, nous avons noté qu'en plus d'avoir une forte augmentation de la phosphorylation de la rpS6, une réduction importante de la phosphorylation de eEF2 chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} en comparaison aux souris contrôles est observée (Fig. 7D). De plus, suivant une injection péritonéale de puromycine chez les souris, nous avons encore une fois noté une augmentation du taux de synthèse protéique puisque la quantité détectée de puromycine chez les souris mutantes est plus importante (Fig. 7E).

Mis ensemble, nos résultats indiquent que la tyrosine phosphatase SHP1 serait effectivement capable de moduler la taille cellulaire, probablement via le contrôle de la synthèse protéique. En effet, SHP1 semble capable de moduler la signalisation PI3K/AKT/S6K, menant à l'activation de la synthèse protéique par l'activation des protéines rpS6 et eEF2. De plus, le mécanisme proposé semble conservé tant chez l'humain que chez la souris.

SECTION 2 : LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/ β -CATÉNINE EST RÉPRIMÉE PAR SHP1

Les études précédentes réalisées par notre laboratoire se sont beaucoup concentrées à déterminer le rôle de SHP1 dans les CEIs en apportant une attention particulière sur la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Duchesne et al., 2003; Leblanc, 2015; Simoneau et al., 2011). En effet, notre équipe a démontré, *in cellulo*, que l'expression ectopique de SHP1

diminuait l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 en déphosphorylant la β -caténine sur ses résidus tyrosines 86 et 654 (Duchesne et al., 2003; Simoneau et al., 2011). Durant ma maîtrise, j'ai voulu étudier le rôle plus physiologique de SHP1 dans les cellules épithéliales intestinales (CEIs) via la génération du modèle murin d'inactivation de SHP1 dans les CEIs. De manière intéressante, j'ai aussi observé une augmentation de l'expression totale de la β -caténine dans l'épithélium intestinal des souris mutantes, ce qui était en accord avec ce qui avait été précédemment rapporté par notre groupe de recherche chez les souris *Motheaten* (Leblanc, 2015; Simoneau et al., 2011).

Afin de valider que la voie Wnt/ β -caténine est bel et bien activée dans notre modèle murin, nous avons déterminé par immunobuvardage la quantité de β -caténine active présente en utilisant un anticorps non-phospho-spécifique, c'est-à-dire que l'anticorps reconnaît la β -caténine lorsqu'elle n'est pas phosphorylée sur ses résidus sérine 33/37 et thréonine 41. Ainsi, il est possible de détecter la fraction dite « active » de la β -caténine, car elle n'est pas phosphorylée pour être dégradée par le protéasome (Stamos and Weis, 2013). De cette façon, nous avons observé que la quantité de β -caténine non seulement totale, mais également active était beaucoup plus importante dans des enrichissements d'épithéliums de nos souris *Shp1*^{CEI-KO} que dans les souris contrôles (Fig. 8A). Ces observations suggèrent donc que la β -caténine serait stabilisée, donc moins dégradée par le protéasome, en absence de SHP1. Tel que mentionné dans l'introduction, une des premières étapes clés de l'activation de la signalisation Wnt/ β -caténine est justement la stabilisation de la β -caténine. Ceci suggère donc que la perte de SHP1 active cette voie de signalisation. Si tel est le cas, une fois stabilisée, la β -caténine devrait par la suite transloquer au noyau, se lier à son partenaire transcriptionnel de la famille TCF/LEF (TCF4 dans les CEIs) et transactiver des gènes cibles. Nous avons donc vérifié si effectivement, la β -caténine, suivant la perte de SHP1 dans les CEIs, présentait une localisation plus nucléaire. C'est effectivement ce qui a été observé, dans un premier temps par un fractionnement cytoplasme-noyau (Fig. 9A) et dans un deuxième temps, par immunohistochimie contre la β -caténine (Fig. 9C). Effectivement, des extraits de cryptes issus d'intestins grêles de souris contrôles et *Shp1*^{CEI-KO} ont été subdivisés afin d'obtenir une fraction cytoplasmique et une fraction nucléaire, dans lesquels, la quantité totale de β -caténine a été évaluée par immunobuvardage. Ainsi, nous avons bien observé que

la quantité de β -caténine présente dans le cytoplasme et le noyau des souris contrôles est assez similaire. De plus, chez les souris *Shp1*^{CEI-KO}, la quantité de β -caténine nucléaire est plus beaucoup plus importante que dans la fraction cytoplasmique. Il est aussi très intéressant de noter que la quantité de β -caténine cytoplasmique est plus faible chez les souris expérimentales versus les souris contrôles, et beaucoup plus abondante dans le noyau des souris expérimentales que dans le noyau des souris contrôles (Fig. 9A-B). De plus, par immunohistochimie, nous avons observé plus de β -caténine détectée globalement, mais également dans le noyau des cellules progénitrices prolifératives et des cellules de Paneth chez les souris *Shp1*^{CEI-KO}. Tel qu'observé dans les souris contrôles, il est normal d'observer une localisation nucléaire de la β -caténine dans les cellules de Paneth, mais pas dans les cellules progénitrices prolifératives (Fig. 9C). Ceci indique donc qu'effectivement, il y a une augmentation de la β -caténine nucléaire suivant la perte de SHP1 dans les CEIs, mais qu'en plus, cette augmentation est principalement retrouvée dans les cellules progénitrice prolifératives. Par la suite, nous nous sommes intéressés à la transactivation de gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine afin de valider que cette signalisation est effectivement augmentée en absence de SHP1 dans l'épithélium intestinal. Ainsi, par qPCR, plusieurs gènes ont été analysés. Une augmentation d'expression des gènes *Sox9*, *EphB3*, *Dclk1* et *Ascl2*, tous des gènes cibles de la signalisation Wnt/ β -caténine, a été bien observée (Fig. 9D et 10A).

Des résultats très intéressants ont été également obtenus lors de cultures d'organoïdes *ex vivo* d'intestin grêle de souris *Shp1*^{CEI-KO} et de souris contrôles. En effet, à 5 jours post-ensemencement, les organoïdes invalidés pour SHP1 développent beaucoup moins de ramifications à leur surface (Fig. 11A-B), sans cependant présenter de problème d'implantation ou de survie (Fig. 11C-E). Cette baisse de ramifications pouvait suggérer une altération de la transition prolifération-différenciation dans la crypte intestinale déficiente pour l'expression de SHP1. En effet, des analyses d'incorporation d'EdU démontrent que les organoïdes invalidés pour SHP1 sont hyperprolifératifs (Fig. 11F-G). Plusieurs études ont rapporté l'impact de la suractivation de la voie Wnt/ β -caténine (par exemple suivant l'expression ectopique de WNT3) sur le développement d'organoïdes *ex vivo*. En résumé, l'hyperactivation de la voie Wnt entraîne une hyperprolifération des organoïdes qui deviennent plus sphéroïdes, développant que peu, ou pas, de ramifications à leur surface.

Ceci survient parce que l'hyperprolifération compromet la différenciation des cellules qui composent ces organoïdes. L'architecture normale des organoïdes en est donc altérée. En effet, la réduction de la différenciation entraîne une structure plus sphérique, qui est alors essentiellement composée de cellules prolifératives (Fenderico et al., 2019; Onuma et al., 2013; Rodríguez-Colman et al., 2017). Ainsi, le phénotype des organoïdes *Shp1*^{CEI-KO} nous rappelle donc le phénotype d'organoïdes dans lesquels la voie Wnt/ β -caténine est stimulée. Pour vérifier si l'hyperactivation de cette voie de signalisation est responsable du phénotype morphologique des organoïdes déficients pour SHP1, nous avons modulé la signalisation intrinsèque des organoïdes en réduisant de moitié la quantité de R-Spondine ajoutée dans le milieu de culture. La R-Spondine est nécessaire à la croissance des organoïdes en culture puisqu'elle permet de maintenir l'activation de la signalisation Wnt/ β -caténine. En effet, le complexe R-Spondine/LGR5 neutralise les E3 ligases transmembranaires RNF43 and ZNRF3, qui induisent la dégradation des récepteurs liés par les facteurs WNT de la surface cellulaire (Kazanskaya et al., 2004; de Lau et al., 2011). C'est effectivement ce que nous avons observé dans nos organoïdes contrôles qui, lorsque cultivés avec seulement 5% de R-Spondine au lieu de 10%, présentent un retard de croissance (Fig. 12A, panneaux du bas). Lorsque nos organoïdes invalidés pour SHP1 sont cultivés avec moitié moins de R-Spondine (5%), ils retrouvent une quantité de ramifications similaire aux organoïdes contrôles cultivés en 10% R-Spondine (Fig. 12). Ce résultat indique donc qu'effectivement, la suractivation de la voie Wnt/ β -caténine est responsable des altérations morphologiques observées chez les organoïdes déficients pour SHP1.

Mis ensemble, ces résultats confirment que : 1- SHP1 régule négativement la signalisation Wnt/ β -caténine dans la crypte intestinale, fort possiblement par une modulation de la stabilité de la β -caténine; 2- l'absence d'expression de SHP1 perturbe la transition prolifération-différenciation dans la crypte intestinale, par l'induction d'une hyperprolifération des cellules progénitrices au dépend de leur différenciation (Xian et al., 2017).

SECTION 3 : SHP1 ET LES CELLULES SOUCHES

Considérant la dépendance des cellules souches à la signalisation Wnt/ β -caténine et le rôle crucial de ces cellules dans le maintien du renouvellement et de l'homéostasie intestinale (Fevr et al., 2007; Sato et al., 2011), nous avons évalué l'impact de la perte de SHP1 sur ces cellules. Dans un premier temps, différents gènes associés aux deux populations de cellules souches ont été analysés par qPCR sur des extraits d'enrichissements d'épithéliums de souris contrôles et *Shp1*^{CEI-KO}. Nous avons d'abord noté que le niveau des transcrits des marqueurs de cellules souches *Olfm4* et *Bmi1* n'étaient pas modulés par la perte de SHP1 (Fig. 10B). Notons que *Olfm4* et *Bmi1* sont des gènes cibles de la voie NOTCH (López-Arribillaga et al., 2015; VanDussen et al., 2012), une autre voie importante pour la prolifération des cellules souches (van Es et al., 2005b; VanDussen et al., 2012). Ces résultats suggèrent donc que SHP1 n'affecterait pas cette voie de signalisation dans les cellules souches intestinales. Par contre, lorsque nous avons analysé l'expression de *Ascl2* et *Dclk1*, deux gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine (Schuijers et al., 2015; Yan and Kuo, 2015), nous avons observé que l'expression de ces deux gènes était significativement augmentée chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} (Fig. 10A). De façon intéressante, une augmentation de 1,9X de l'expression de *Ascl2* est observée, tandis qu'une augmentation de 10,8X de l'expression de *Dclk1* est notée. ASCL2 est un facteur de transcription qui induit la transcription de gènes permettant la détermination des cellules souches (Schuijers et al., 2015), alors que DCLK1 est un marqueur de cellules Tuft, dont une sous-population contribue à maintenir la niche des cellules souches (Westphalen et al., 2017). La différence majeure dans l'expression de ces deux gènes semble provenir du fait que ce sont des gènes exprimés par des types cellulaires distincts et donc que leur régulation par la signalisation Wnt/ β -caténine ne produise pas un effet similaire. De plus, ce résultat peut suggérer que la population de cellules Tuft pourrait être affectée par la perte de SHP1. Par la suite, nous avons aussi observé, par immunohistochimie, une augmentation modeste, mais significative du nombre de cellules positives à l'OLFM4 chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} (Fig. 10C-D). De plus, rappelons que mes travaux de maîtrise ont montré que la perte d'expression de SHP1 augmentait la population de cellules de Paneth au fond des cryptes, même si celles-ci semblaient moins matures (Leblanc, 2015). Cette augmentation des cellules de Paneth peut, peut-être, aussi contribuer à maintenir un environnement propice au développement des cellules souches. En effet, les

cellules de Paneth expriment et sécrètent plusieurs facteurs de croissance (WNT3, EGF, TGF- α et DLL4) qui stimulent la prolifération et la survie des cellules souches (Sato et al., 2011). Pris ensemble, ces résultats suggèrent donc qu'en contrôlant le niveau d'activation de la Wnt/ β -caténine, SHP1 limite ou ralentit la prolifération des cellules souches intestinales.

SECTION 4 : SHP1 DANS LA CARCINOGENÈSE COLORECTALE

SHP1 est reconnu comme étant un suppresseur de tumeur dans les lymphomes, les leucémies, mais également dans les hépatocarcinomes (Wen et al., 2018; Wu et al., 2003b; Zhang et al., 2005). Considérant que SHP1 semble un régulateur négatif de la signalisation Wnt/ β -caténine (Fig. 8, 9) et que cette voie de signalisation est très importante dans la carcinogénèse colorectale (Deitrick and Pruitt, 2016), nous nous sommes intéressés à déterminer le rôle potentiel de SHP1 dans la carcinogénèse colorectale.

L'expression de SHP1 dans les différents cancers d'origine hématopoïétique est fortement réduite suite à une hyperméthylation de son promoteur. Ainsi, nous avons d'abord évalué l'expression de *PTPN6* dans différentes tumeurs colorectales issues d'une biobanque locale, en comparaison avec les tissus sains pairés. Nous avons observé que le niveau d'expression moyen de *PTPN6* dans les adénomes et dans les tumeurs de stade 2 était significativement plus faible en comparaison au niveau d'expression moyen dans les tissus sains prélevés chez les mêmes patients (Fig. 13A). Cependant, lorsque le niveau d'expression de *PTPN6* dans une tumeur est directement comparé avec son expression dans le tissu sain adjacent, nous observons une réduction d'expression dans la grande majorité des cas, ce qui rend la différence significative (Fig. 13B). La même observation a également été faite dans les 262 tumeurs colorectales dont les données sont publiquement disponibles via l'interface TCGA-Wanderer, c'est-à-dire que l'expression de *PTPN6* est significativement réduite dans les tumeurs (Fig. 13C). Considérant que la baisse d'expression de *PTPN6* dans la majorité des tumeurs hématopoïétiques provient d'une méthylation aberrante du promoteur, nous avons vérifié si ce pouvait également être le cas dans le cancer colorectal. L'analyse de la base de données TCGA (<http://cancergenome.nih.gov>) indique qu'effectivement, certains îlots CpG sont significativement plus méthylés ce qui suggère que la baisse d'expression de

SHP1 dans les tumeurs colorectales pourrait provenir aussi d'une méthylation aberrante de son promoteur.

Afin d'analyser le rôle de SHP1 dans la régulation des propriétés tumorales des cellules cancéreuses colorectales humaines, nous avons utilisé nos lignées de cellules cancéreuses colorectales HCT116 et HT29 infectées avec un shARN ciblant SHP1 ou un shARN contrôle et évalué leur prolifération et leur capacité à croître en indépendance d'ancrage. Puisqu'il était soupçonné que SHP1 agisse comme un suppresseur de tumeur dans le cancer colorectal, c'est sans surprise que nous avons observé que la sous-expression de SHP1 dans des HCT116 et des HT29 augmentait leur capacité à croître en indépendance d'ancrage (Fig. 15). Par contre, la prolifération en 2D n'est pas affectée par la baisse d'expression de SHP1 tel qu'observé par l'incorporation d'EdU, qui marque les cellules en phase S du cycle cellulaire (Fig. 14). Considérant que les cellules HT29 et HCT116 sont des cellules cancéreuses présentent plusieurs altérations génétiques (mutations *BRAF* ou *KRAS*, *APC* ou *CTNNB1*, *TP53*, instabilité des microsatellites, etc.) qui affectent la progression du cycle cellulaire, il n'est probablement pas si surprenant que la baisse d'expression de SHP1 ne soit pas suffisante pour affecter significativement la prolifération. Néanmoins, puisque la capacité à croître en indépendance d'ancrage des HT29 et HCT116 est augmentée suite au à la sous-expression de SHP1, cela suggère une hausse de leur potentiel tumoral. Afin de vérifier *in vivo* si SHP1 pourrait agir comme un suppresseur de tumeurs, nous avons vérifié si les souris *Shp1*^{CEI-KO} développaient des tumeurs avec l'âge. Après 15 mois, aucune des 6 souris expérimentales analysées n'a présenté de tumeurs dans leur intestin. Afin de valider que l'absence de tumeur ne provenait pas d'une perte de phénotype à long terme, nous avons analysé sommairement le phénotype des souris *Shp1*^{CEI-KO} âgées de 15 mois. Les altérations de la différenciation cellulaire et le phénotype d'intestinalomégalie sont toujours observés chez des souris de 15 mois. En effet, les souris *Shp1*^{CEI-KO} de 15 mois présentent encore une intestinalomégalie caractérisée par une augmentation du poids par unité de longueur (Fig. 16C) et une augmentation de la hauteur des cryptes intestinales (Fig. 16D, F). De plus, le nombre de cellules caliciformes (Fig. 16E, G) et de cellules de Paneth (Fig. 16H-I) est toujours augmenté chez les souris expérimentales. Par contre, de manière très intéressante, aucune différence significative n'est observée dans le nombre de cellules prolifératives entre les souris contrôles et *Shp1*^{CEI-KO} âgées de 15 mois (Fig. 17A-B). Rappelons qu'à 6 semaines,

nous avons observé une augmentation modeste, mais significative du nombre de cellules prolifératives dans la crypte intestinale des souris *Shp1*^{CEI-KO} (Leblanc et al., 2017). De plus, nous avons évalué l'expression de la β -caténine par immunohistochimie à 15 mois et de façon intéressante, nous n'avons pas observé de différence importante dans l'expression et la localisation subcellulaire de la β -caténine dans les CEIs des souris contrôles versus *Shp1*^{CEI-KO} (Fig. 17C), contrairement à ce qui avait été observé chez les souris âgées de 6 semaines (Fig. 9C). Ces observations suggèrent qu'avec l'âge, des mécanismes de compensation se sont probablement déclenchés chez la souris *Shp1*^{CEI-KO}, pour limiter l'hyperactivation de la voie Wnt/ β -caténine et la pression pro-proliférative que cette voie exerce dans les CEIs. D'ailleurs, parmi les résultats de spectrométrie de masse obtenus figure la régulation de la signalisation des BMPs, connue pour réprimer la signalisation Wnt/ β -caténine (Freeman et al., 2013; He et al., 2004) (Freeman et al., 2013; He et al., 2004). Ainsi, une augmentation de cette signalisation pourrait potentiellement expliquer l'absence du développement de tumeurs chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} âgées de 15 mois.

Les résultats obtenus chez les souris âgées de 15 mois nous indiquent alors que la perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal à elle seule ne semble pas suffisante pour induire la formation de tumeurs intestinales. Cependant, dans des lignées cancéreuses colorectales bien établies, la perte de SHP1 affecte leur capacité à croître en indépendance d'ancrage et fort possiblement leur potentiel tumoral. Nous avons donc croisé les souris *Shp1*^{CEI-KO} avec des souris *Apc*^{Min/+} qui développent spontanément de nombreuses tumeurs dans leur intestin, suivant une mutation dans le gène suppresseur de tumeur *Apc* (Moser et al., 1990, 1995). De cette façon, nous avons observé une augmentation significative du nombre de tumeurs, aussi appelées polypes, dans l'intestin grêle des souris *Shp1*^{CEI-KO};*Apc*^{Min/+} âgées de 3 mois, en comparaison avec leurs contrôles *Apc*^{Min/+} (Fig. 18A). Ce résultat nous indique que la perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal exacerbe la polypose observée chez les souris *Apc*^{Min/+}. Cette augmentation de polypes suggère que SHP1 ralentit ou freine l'initiation tumorale chez la souris *Apc*^{Min/+}. De plus, une modeste augmentation de la taille des gros polypes est aussi observée en absence de SHP1 (Fig. 18C), ce qui laisse suggérer que la perte de SHP1 dans ce contexte pourrait aussi influencer la croissance des tumeurs voire leur progression.

Par conséquent, dans un contexte où le gène *Apc* est muté, et donc que la signalisation Wnt/ β -caténine est déjà suractivée, la perte de SHP1 semble tout de même promouvoir davantage la polypose. Ceci nous renseigne donc sur la capacité de SHP1 à réguler la signalisation Wnt/ β -caténine en aval d'*Apc*. En effet, la mutation de *Apc* retrouvée dans les souris *Apc*^{Min/+} génère une protéine tronquée qui n'est plus capable d'échafauder correctement les composantes du complexe de dégradation régulant le niveau d'expression de la β -caténine (Su et al., 1992). Ainsi, si la perte de SHP1 intensifie le phénotype de polypose, c'est que cette phosphatase intervient après cette étape du complexe de dégradation. Cette observation vient en quelque sorte confirmer les observations qui ont été faites *in vitro* qui montrent que SHP1 affecte la signalisation Wnt/ β -caténine en régulant l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 (Duchesne et al., 2003; Simoneau et al., 2011). De plus, tel que discuté en introduction, le complexe β -caténine/TCF4 contrôle l'expression de différents gènes impliqués dans la prolifération et la progression tumorale, notamment dans des processus tels que la migration cellulaire et le remodelage de la matrice extracellulaire (Brabletz et al., 1999; Gavert et al., 2007; Hankey et al., 2018). Ainsi, les effets observés sur la taille des tumeurs formées chez les souris *Apc*^{Min/+} et la capacité de cellules cancéreuses colorectales à croître en indépendance d'ancrage pourraient être le résultat du contrôle négatif exercé par SHP1 sur l'activité transcriptionnelle de la β -caténine.

SECTION 5 : ASSOCIATION DES PHÉNOTYPES OBSERVÉS AVEC LES VOIES PI3K/AKT ET WNT/ β -CATÉNINE

Les analyses macroscopiques réalisées chez les souris âgées de 15 mois ont permis de noter que la longueur de l'intestin grêle n'est pas significativement augmentée, mais que tout de même, le phénotype d'intestinalomégalie est maintenu, car le ratio du poids sur la longueur de l'intestin est encore significativement plus élevé chez les souris invalidées pour SHP1 dans l'épithélium intestinal (Fig. 16A-C). De plus, des analyses réalisées sur des coupes histologiques de jéjunum de ces souris ont permis d'observer que la hauteur des cryptes des souris invalidées pour SHP1 est toujours significativement plus élevée que dans les souris contrôles (Fig. 16D, F). Également, des analyses sommaires de la différenciation des cellules épithéliales intestinales ont permis de montrer que la perte de SHP1, même à

15 mois, entraîne une augmentation du nombre de cellules positives à l'Alcian bleu et des cellules positives pour le lysozyme. Ceci indique donc une augmentation du nombre de cellules caliciformes et de cellules de Paneth (Fig. 16 E, G-I) similaire à ce que nous avons observé à 6 semaines (Leblanc et al., 2017). Ces analyses permettent donc de confirmer que le phénotype associé à la perte de SHP1 sur la différenciation ces CEIs est maintenu avec l'âge. Par contre, bien que les cryptes soient toujours significativement plus profondes suivant la perte de SHP1, le nombre de cellules prolifératives n'est plus augmenté (Fig. 17A-B). De plus, tel qu'observé par immunohistochimie, la β -caténine ne semble plus être aussi abondante dans les souris, ni nucléaire dans les cellules progénitrices prolifératives (Fig. 17C).

Ces résultats mettent donc en perspective les résultats obtenus lors de ma maîtrise et de mon doctorat chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} âgées de 6 semaines. En effet, nous avons observé que la perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal mène à une augmentation de la synthèse protéique (Fig. 7), ce qui entraîne une hypertrophie cellulaire (Fig. 5, Leblanc, 2015), le tout résultant en une intestinalomégalie chez la souris (Leblanc et al., 2017). Nous pensons que l'hyperactivation de la signalisation PI3K/AKT/S6-eEF2 observée chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} est responsable de ce phénotype. En effet, une ancienne étudiante de notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe de la Pre Perreault, a démontré que la délétion conditionnelle de PTEN dans l'épithélium intestinal murin, induit aussi une intestinalomégalie associée à l'hyperactivation de la voie PI3K/AKT (Langlois et al., 2009). De plus, des altérations dans la différenciation cellulaire, similaires à celles observées chez la souris *Shp1*^{CEI-KO} ont aussi été observées chez la souris *Pten*^{CEI-KO}. Une autre des observations faites à 6 semaines montrait que les cryptes sont plus profondes suivant la perte de SHP1 et nous avons alors suggéré que ce phénotype pouvait résulter tant de l'hypertrophie cellulaire que de l'augmentation de prolifération (Leblanc, 2015). Or, chez nos souris de 15 mois, nous observons toujours l'augmentation de la profondeur des cryptes, sans toutefois noter d'augmentation de prolifération. Ceci suggère donc que l'augmentation de la profondeur des cryptes pourrait être attribuable principalement à l'hypertrophie cellulaire, et donc à l'activation de la signalisation PI3K/AKT/S6-eEF2. De plus, rappelons que les souris *Pten*^{CEI-KO} présentent elles aussi cette augmentation de la hauteur des cryptes, ce qui appuie cette conclusion.

Toutes nos observations suggèrent donc que les phénotypes observés chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} résultent en grande partie de la dérégulation des voies de signalisation PI3K/AKT et Wnt/ β -caténine : la signalisation PI3K/AKT serait responsable de l'apparition de l'intestinalomégalie, alors que la signalisation Wnt/ β -caténine serait responsable de la hausse de prolifération des cellules progénitrices prolifératives et des cellules souches, ainsi que de la hausse des cellules de Paneth. C'est l'analyse des souris de 15 mois qui a permis de trouver que la signalisation Wnt/ β -caténine ne semble pas contribuer au développement de l'intestinalomégalie. Par contre, la signalisation PI3K/AKT pourrait aussi être impliquée dans la prolifération des cellules cryptales. En effet, lorsqu'activée, la kinase AKT phosphoryle la sérine 9 de GSK3 β , ce qui l'inhibe, et phosphoryle aussi la sérine 552 de la β -caténine (Fig. 8), ce qui promeut sa localisation nucléaire (Chowdhury et al., 2015; Fang et al., 2007; Lee et al., 2010). Enfin, ces observations sont également supportées par les résultats obtenus par spectrométrie de masse qui indiquent que SHP1 serait impliquée dans la régulation de PTEN, mais également dans la régulation positive de la signalisation BMP (Fig. 6), une voie de signalisation qui inhibe la voie Wnt/ β -caténine (Freeman et al., 2013; He et al., 2004).

SECTION 6 : SHP1, UN FACTEUR DE SUSCEPTIBILITÉ À L'INFLAMMATION INTESTINALE

Les souris ayant des mutations inactivatrices de SHP1, soit les souris *Motheaten* et les souris *Motheaten viable*, présentent un phénotype fulgurant d'inflammation généralisée (Green and Shultz, 1975; Tsui et al., 1993). De plus, les souris invalidées pour SHP2 dans les CEIs développent aussi spontanément une colite ulcéreuse à très bas âge (Coulombe et al., 2013; Yamashita et al., 2014). Ensemble, ces données laissent suggérer que la délétion de SHP1 dans l'épithélium intestinal pourrait engendrer une inflammation intestinale.

Cependant, nos analyses macroscopiques et histologiques démontrent que les souris *Shp1*^{CEI-KO} ne développent pas spontanément d'inflammation intestinale. Nous avons alors voulu vérifier si la perte de SHP1 dans l'épithélium intestinal sensibilisait cet épithélium à un stress pro-inflammatoire. Nous avons donc opté pour un traitement de 7 jours au dextran sodium sulfate (DSS) 2,25%. Le DSS est un détergent de haut poids moléculaire utilisé pour

créer une colite chimique puisqu'il agit en solubilisant le mucus protecteur à l'épithélium, en augmentant la perméabilité et en induisant l'apoptose des CEIs. De plus, ces effets vont entraîner une rupture de la barrière intestinale et l'exposition de la muqueuse au microbiote de la lumière, déclenchant le recrutement des cellules immunitaires et le développement d'une inflammation principalement dans le côlon distal (Whittem et al., 2010). Lors du suivi quotidien des souris, nous avons noté une diminution plus importante du poids des souris expérimentales, suggérant une sensibilité accrue à l'inflammation chimique, en comparaison aux souris contrôles (Fig. 19A). Cependant, les signes de sévérité de la maladie de même que le score histologique des dommages à la muqueuse du côlon sont restés inchangés entre les souris contrôles et les souris expérimentales, indiquant que les souris *Shp1*^{CEI-KO} démontrent la même sensibilité au DSS que les souris contrôles (Fig. 19B-D). Puisque la perte de SHP1 entraîne une légère augmentation de la prolifération cryptale (Leblanc, 2015) et que les cellules souches semblent aussi un peu plus nombreuses (Fig. 10C-D), nous nous sommes alors interrogés à savoir si la perte de SHP1 n'impacterait pas sur la régénération de l'épithélium suite à un stress au DSS plutôt que sur la protection de cet l'épithélium au DSS. Nous avons alors traité les souris au DSS 1,75% pendant 7 jours, suivi de 14 jours de récupération. Cependant, même dans ces conditions, aucune différence dans l'index de la maladie ou du score histologique du côlon n'est notée entre les souris contrôles et les souris *Shp1*^{CEI-KO} (Fig. 20 B-D). De plus, en réduisant le pourcentage de DSS dissout dans l'eau de boisson (afin de prévenir une perte de poids trop importante suivant le traitement DSS), aucune différence dans le poids des souris n'a été observée. Ces résultats indiquent donc que l'absence de SHP1 ne semble pas affecter la régénération intestinale observée après un stress au DSS.

Le DSS est un agent chimique connu pour affecter principalement le côlon distal. Rappelons que tous les phénotypes observés chez nos souris *Shp1*^{CEI-KO} concernaient l'épithélium de l'intestin grêle uniquement. En effet, l'intestinalomégalie, les défauts de différenciation et l'exacerbation de la polypose ont été observés uniquement dans l'intestin grêle. Aucune altération phénotypique n'a été observée dans le côlon des souris *Shp1*^{CEI-KO}. Nous nous sommes donc intéressés à déterminer si des différences de dommages pourraient être visualisées dans l'iléon distal des souris traitées au DSS 2,25% pendant 7 jours. En effet, bien que peu répertorié, quelques équipes ont tout de même noté que le DSS affecte la

muqueuse intestinale. Plus précisément, ils ont noté que plus l'inflammation intestinale est importante, plus les villosités seront courtes. (Chen et al., 2015; Menconi et al., 2015). Chez nos souris contrôles, nous avons effectivement observé que suivant un traitement de 7 jours au DSS à 2,25%, une réduction significative, bien que légère, de la hauteur des villosités est observée (Fig. 23B, colonnes 1 et 3). La même tendance est évidemment observée chez les souris *Shp1*^{CEI-KO}, soit une réduction significative de la hauteur des villosités lorsque traitées au DSS (Fig. 23B, colonnes 2 et 4). Il est important de noter qu'en l'absence de traitement au DSS, aucune différence significative dans la hauteur des villosités iléales n'est notée entre les souris contrôles et les souris *Shp1*^{CEI-KO} (Fig. 23B, colonnes 1 et 2). Cependant, suivant le traitement au DSS, on observe une réduction significative de la hauteur des villosités chez les souris expérimentales, en comparaison aux souris contrôles (Fig. 23B, colonnes 3 et 4). Ce résultat suggère donc que l'iléon des souris *Shp1*^{CEI-KO} serait plus sensible à un traitement au DSS que les souris contrôles. Pour tenter de valider cette observation, nous avons évalué les dommages à la muqueuse iléale en notant de 1 à 10 selon l'étendue des dommages observés. Bien que la différence entre les souris contrôles et *Shp1*^{CEI-KO} soit faible, probablement dû au fait que le DSS n'est pas reconnu pour affecter l'intestin grêle, nous avons tout de même noté que les souris expérimentales ont une augmentation significative des dommages à la muqueuse par rapport aux souris contrôles (Fig. 23C). Ce résultat devra toutefois être validé par un traitement avec un autre agent induisant une inflammation dans l'intestin grêle tel que l'indométacine (Yamada et al., 2011).

Mis ensemble, ces résultats suggèrent que la perte de SHP1 dans l'épithélium de l'intestin grêle rend les souris plus susceptibles à l'inflammation induite suite à un stress à la muqueuse. En effet, malgré une absence de modulation du phénotype inflammatoire dans le côlon, les souris *Shp1*^{CEI-KO} présentent une perte significative de poids (Fig. 19A), qui pourrait être associée à certains dommages à la muqueuse observé dans l'iléon (Fig. 23). De plus, en considérant que les dommages sont présents majoritairement dans l'iléon, il est possible que la susceptibilité inflammatoire associée à la perte de SHP1 se rapproche plus de la maladie de Crohn que de la colite ulcéreuse. En effet, tel que mentionné plus tôt, la colite ulcéreuse affecte d'abord le rectum pour s'étendre vers le côlon, tandis que la maladie de Crohn affecte tout le tractus gastrointestinal, mais avec une prédominance dans l'iléon (Yu and Rodriguez, 2017; Zhang and Li, 2014). De plus, mes travaux de maîtrise ont mis en

évidence des altérations importantes dans la différenciation des cellules de Paneth suivant la perte de SHP1 dans les CEIs, en plus de présenter une évidence qui laisse suggérer que l'activité autophagique pourrait être modifiée. (Leblanc, 2015). Ces deux observations vont souvent de paires lorsqu'il s'agit de maladie de Crohn. En effet, tel que mentionné plus tôt, plusieurs gènes de susceptibilité de cette maladie sont impliqués dans l'autophagie. C'est notamment le cas de *ATG16L1*. Par contre, la perte de ce gène est également connue pour entraîner des défauts de maturation des cellules de Paneth, qui participe à l'établissement de la maladie (Cadwell et al., 2009; Stappenbeck and McGovern, 2018). Ainsi, ces observations supportent que SHP1 pourrait potentiellement être plus impliqué dans le développement de la maladie de Crohn que de la colite ulcéreuse.

SECTION 7 : LA PERTE D'EXPRESSION DE SHP1 N'AFECTE PAS LE CÔLON

L'absence de modulation du phénotype inflammatoire suivant un traitement DSS dans le côlon des souris *Shp1*^{CEI-KO}, de même que l'absence de modulation de la polyposé colique chez les souris *Shp1*^{CEI-KO};*Apc*^{Min/+} suggère que la perte de SHP1 n'affecte pas ou très peu l'homéostasie du côlon. En effet, même lors de nos analyses macroscopiques et histologiques, aucune différence dans le côlon des souris *Shp1*^{CEI-KO} comparé au côlon des souris contrôles n'est observée (Fig. 21).

Pour valider cet énoncé, nous avons dans un premier temps montré que l'absence de phénotype ne provient pas d'un manque d'efficacité du système Cre-lox dans le côlon tel que nous l'avions soupçonné (Fig. 22A). En effet, il a déjà été rapporté qu'il pouvait y avoir un peu de mosaïcisme dans le côlon avec de l'utilisation des souris *Villine-Cre* (Madison et al., 2002). Dans un second temps, bien qu'il a déjà été montré que l'expression protéique de SHP1 et de SHP2 ne se compensent pas dans des cellules cancéreuses colorectales humaines (Wang et al., 2006), nous avons validé qu'il en est de même dans l'épithélium intestinal et colique murin, ainsi que pour leurs gènes (Fig. 22B-C). Ainsi, ces résultats ne permettent pas d'expliquer pourquoi la perte de SHP1 dans les colonocytes n'induit pas de phénotype particulier, en comparaison avec les entérocytes. Par contre, l'absence de compensation entre SHP1 et SHP2 permet de renforcer le fait que, bien que ces deux phosphatases soient très

similaires, en plus de posséder des substrats communs, leurs actions physiologiques sont distinctes et indépendantes l'une de l'autre.

Ensuite, puisque l'absence de phénotype dans le côlon suivant la perte de SHP1 dans les CEIs n'est pas explicable par l'expression de SHP1 et/ou de SHP2, nous nous sommes intéressés à l'activité de SHP1. En effet, si son expression est similaire entre chacun des segments de l'intestin, que le système Cre-loxP y est aussi efficace, et qu'il n'y a pas de compensation par SHP2, tout laisse croire que l'activité de SHP1 pourrait être différentiellement régulée entre le jéjunum et le côlon. C'est effectivement ce que nous semblons observer par immunobuvardage contre la forme phosphorylée sur la sérine 591 de SHP1. Cette phosphorylation étant connue pour inhiber l'activité de cette phosphatase (Mkaddem et al., 2017), ceci suggère que SHP1 serait bel et bien moins actif dans l'épithélium du côlon comparativement à l'épithélium du jéjunum. Cette observation devrait tout de même être validée par une autre approche plus directe telle qu'un test d'activité phosphatase au pNPP.

En bref, nos résultats suggèrent que l'activité de la phosphatase SHP1 pourrait être moins importante au maintien de l'homéostasie de l'épithélium colique que de l'épithélium intestinal, au contraire de SHP2, puisqu'en effet, l'impact de la perte de SHP2 dans l'épithélium intestinal et colique affecte plus sévèrement le côlon (Coulombe et al., 2013).

SECTION 8 : LA β -CATÉNINE CONTRÔLE LE NIVEAU DE SHP1 DE MANIÈRE POST-TRANSCRIPTIONNELLE.

L'expression du gène *PTPN6*, qui est le gène encodant pour la protéine SHP1, a été montrée comme étant significativement réduite dans les tumeurs cancéreuses colorectales humaines (Fig. 13), ce qui est fort probablement dû à une hyperméthylation du promoteur de *PTPN6*. Cependant, l'analyse de l'expression protéique de SHP1 dans des tumeurs colorectales, des lignées cancéreuses colorectales et des polypes de souris *Apc*^{Min/+}, révèle que l'expression de SHP1 est significativement plus élevée dans les tissus cancéreux que dans la marge saine pairée (Fig. 24-25). Plus précisément, nous avons trouvé que l'expression de SHP1 est plus élevée dans les tissus où la β -caténine est elle-même fortement

exprimée. Effectivement, dans les lignées cancéreuses colorectales possédant une mutation activatrice de la signalisation Wnt/ β -caténine (*APC* ou *CTNNB1*) et dans les polypes de souris *Apc*^{Min/+}, donc des tissus ayant une mutation dans *Apc*, l'expression élevée de la β -caténine corrèle avec une forte expression de SHP1 (Fig. 24 C-D, fig. 25A-B). Nos résultats semblent suggérer que cet effet serait uniquement dû à l'expression de la β -caténine, et non de l'activité transcriptionnelle associée à sa voie de signalisation. Effectivement, dans un premier temps, les tumeurs colorectales humaines, bien qu'elles présentent une réduction de l'expression du gène *PTPN6*, montrent tout de même une augmentation de l'expression protéique de SHP1 (Fig. 13, fig. 24A-B). Ensuite, l'expression ectopique de la β -caténine dans des cellules humaines induit à elle seule une augmentation importante de l'expression de SHP1, sans cependant montrer de différence claire quant à l'expression du gène *PTPN6* (Fig. 26). Ces résultats indiquent donc que l'expression de SHP1 pourrait être contrôlée par la β -caténine à un niveau post-traductionnel. De façon intéressante, nos observations ont aussi indiqué qu'un certain seuil d'expression de la β -caténine pouvait être requis afin d'influencer le niveau d'expression de SHP1. En effet, la figure 25 B indique qu'il semble y avoir deux catégories de polypes de souris *Apc*^{Min/+} : un premier où l'expression de la β -caténine est plus élevée dans le polype que dans sa marge saine, et où l'expression de SHP1 est elle-aussi plus élevée dans le polype que dans la marge (cercle vert); le deuxième groupe est composé de polype où l'expression de la β -caténine est similaire entre le polype et la marge saine, où l'expression de SHP1 est également similaire entre ces deux tissus (cercle bleu). Ceci est également observé par immunohistochimie où les régions les plus fortes en β -caténine sont également plus forte en SHP1 (Fig. 25C). Ainsi, mis ensemble, tous ces résultats mettent en relation l'expression de la β -caténine avec l'expression de SHP1, et suggèrent que la β -caténine aurait un rôle à jouer dans la régulation post-transcriptionnelle de SHP1.

Afin de mieux cerner le mécanisme d'action par lequel la β -caténine est capable de moduler l'expression protéique de SHP1, nous nous sommes par la suite intéressés à sa dégradation, puisqu'il a déjà été montré que la phosphorylation sur la sérine 591 de SHP1 pouvait favoriser sa dégradation par le protéasome (Simoneau et al., 2011). Nous avons donc vérifié l'ubiquitination de SHP1, une modification post-traductionnelle essentielle pour le

ciblage vers la dégradation protéasomale. De manière très intéressante, la surexpression de la β -caténine diminue l'ubiquitination de SHP1 (Fig. 27A). Ce résultat suggère donc que l'ubiquitination de SHP1, voire sa dégradation, serait ralentie par la surexpression de la β -caténine. Une expérience préliminaire d'analyse de l'expression protéique de SHP1 suite à un traitement au cycloheximide suggère en effet que la stabilité protéique de SHP1 serait augmentée suite à la surexpression de la β -caténine (Annexe 1). L'identification de la E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation de SHP1 n'a toutefois pas encore été identifiée, bien que β -TrCP et c-CBL aient été étudiées puis rejetées. En effet, le phosphodégron associé à β -TrCP (DpSGxxpS) n'est pas retrouvé dans la séquence de SHP1, et malgré une bonne efficacité de l'ARN d'interférence ciblant c-CBL, aucune modulation de SHP1 n'a été notée (Fig. 27B). Toutefois, de façon intéressante, parmi les partenaires d'interaction de SHP1 trouvés par spectrométrie de masse figurent ANAPC1 et ANAPC7, deux des sous-unités formant le complexe de promotion d'anaphase (APC/C), aussi appelé cyclosome, ainsi que UBE2O et BRCA1, toutes des E3 ubiquitine ligases. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour déterminer si l'une de ces E3 ubiquitine ligases pourrait être responsable de la dégradation de SHP1. Ainsi, nos résultats montrent que l'expression de SHP1 est bien régulée post-transcriptionnellement par l'activation aberrante de la signalisation Wnt/ β -caténine, mais les mécanismes moléculaires impliqués restent encore à caractériser.

Finalement, très peu de choses sont connues quant au rôle que peut tenir la β -caténine dans la régulation de l'expression de d'autres protéines. Nos données actuelles semblent donc non seulement dépeindre un mécanisme impliquant la β -caténine, mais également un mécanisme de régulation de l'expression de SHP1, ce qui n'a jamais été décrit auparavant. Ainsi, nos travaux suggèrent qu'il pourrait y avoir une boucle rétrocontrôle de la signalisation Wnt/ β -caténine qui pourrait passer par la tyrosine phosphatase SHP1. En effet, nos résultats montrent que SHP1 est un régulateur négatif de la signalisation Wnt/ β -caténine, mais aussi que la β -caténine fortement exprimée semble pouvoir favoriser l'expression de SHP1. Ceci aurait donc comme incidence de permettre une régulation fine de cette voie de signalisation lorsque la β -caténine serait trop abondante.

V. PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

Les travaux réalisés durant mon doctorat avaient pour but de déterminer par quels mécanismes la tyrosine phosphatase SHP1 maintenait l'homéostasie de l'épithélium intestinal et si elle pouvait être impliquée dans le développement de pathologies intestinales telles que le cancer et l'inflammation.

Nous avons précédemment démontré chez la souris que SHP1 contrôlait négativement la prolifération cryptale intestinale (Leblanc, 2015). Mes travaux de doctorat ont permis de montrer que SHP1 inhibait la synthèse protéique et conséquemment la croissance de cellules cancéreuses colorectales. Nos analyses biochimiques ont révélé que cette action de SHP1 était médiée potentiellement par l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR/S6K/S6-eEF2. Pour confirmer ceci, nous pourrions utiliser des inhibiteurs pharmacologiques de la voie PI3K/AKT/mTOR en condition de sous-expression de SHP1 afin d'observer si l'hypotrophie cellulaire observée et la hausse de la synthèse protéique reviennent à la normale. De plus, l'étude des polysomes permettrait de valider qu'il y a bel et bien une augmentation de la traduction suite à l'inhibition d'expression de SHP1. Aussi, il serait pertinent d'analyser si l'augmentation de la synthèse protéique observée concerne tous les ARNm de manière générale ou concerne seulement certaines populations d'ARNm, comme les ARNm 5'TOP (5' terminal oligo-pyrimidine), dont la traduction est connue pour être contrôlée par mTOR (Li et al.; Patursky-Polischuk et al., 2009). Pour se faire, nous pourrions utiliser la technique du « *Ribosome profiling* » (Brar and Weissman, 2015; McGlincy and Ingolia, 2017) afin de déterminer quels ARNm sont activement traduits dans la condition contrôle et lesquels sont traduits en condition de sous-expression de SHP1.

Faisant suite à plusieurs travaux de notre laboratoire, nous avons aussi validé que la signalisation Wnt/ β -caténine est inhibée par SHP1 dans l'épithélium intestinal murin. En l'absence de SHP1, la β -caténine est stabilisée (Leblanc et al., 2017; Simoneau et al., 2011), se relocalise au noyau et cause l'augmentation de la transcription de ses gènes cibles. De plus, nous avons montré que cette augmentation de l'activation de la signalisation Wnt/ β -caténine serait plus importante dans les cellules présentes au fond de la crypte, c'est-à-dire dans les cellules souches et dans les cellules progénitrices prolifératives. Cette

augmentation de la signalisation Wnt/ β -caténine corrèle aussi avec la modulation du nombre de cellules de Paneth (Leblanc, 2015), l'augmentation de la prolifération, l'expansion du compartiment souche et de l'activité des cellules souches. Afin de vraiment valider si les effets de la sous-expression de SHP1 sont bien attribuables à l'hyperactivation de la signalisation Wnt/ β -caténine, des organoïdes issus des souris *Shp1*^{CEI-KO} pourrait être traités avec un inhibiteur de la transcription associée au complexe β -caténine/TCF4, soit l'ICG-001 afin d'observer si le phénotype revient à un phénotype similaire aux organoïdes contrôles. De plus, notre analyse de l'interactôme de SHP1 par spectrométrie de masse suggère de nouveaux mécanismes par lesquels SHP1 pourrait moduler la voie Wnt/ β -caténine. En effet, notre analyse a révélé la protéine ZNF281 comme nouveau partenaire d'interaction de SHP1. ZNF281 est un régulateur essentiel de la différenciation des cellules souches embryonnaires et du développement des tissus (Fidalgo et al., 2011). Plusieurs études ont démontré les divers rôles du ZNF281 dans les processus de pluripotence et de développement des cellules souches (Hahn and Hermeking, 2014; Seo et al., 2013). Par conséquent, ZNF281 est considéré comme un gène pertinent pour le caractère souche. De manière intéressante, une étude a rapporté que ZNF281 pourrait favoriser la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses du pancréas en interagissant avec la voie Wnt/ β -caténine et que de telles interactions pourraient être associées à la progression du cancer du pancréas et du cancer colorectal (Qian et al., 2017; Qin et al., 2019). Par contre, les mécanismes d'action restent à élucider. Un autre effecteur potentiellement intéressant de SHP1 est ADNP, déjà connu comme un suppresseur de tumeurs dans le cancer colorectal (Blaj et al., 2017). Ainsi, des analyses plus approfondies de ces nouveaux partenaires potentiels de SHP1 sont requises afin d'évaluer si SHP1 agit via ces effecteurs pour régulariser la signalisation Wnt/ β -caténine et ainsi affecter la carcinogénèse colorectale. Pour ce faire, il faudrait tout d'abord confirmer l'interaction physique de SHP1 avec ces protéines par des essais de co-immunoprécipitation et/ou de *proximity ligation assay*. Par la suite, par des essais d'interférence d'ARN, le rôle de ZNF281 et d'ADNP sur la régulation de l'expression de la β -caténine et de son activité transcriptionnelle pourrait être analysé.

Les organoïdes invalidés pour SHP1 présentent essentiellement un phénotype attribuable à l'hyperactivation de la signalisation Wnt/ β -caténine. Or, le phénotype

d'instinalomégalie observé chez les souris *Shp1*^{CEI-KO} semble provenir majoritairement des effets de l'hyperactivation de la signalisation PI3K/AKT qui ont été observés durant mes travaux de maîtrise. Il serait donc intéressant d'évaluer la contribution de la signalisation PI3K/AKT dans le développement anormal des organoïdes invalidés pour SHP1, entre autres par l'utilisation d'inhibiteur pharmacologique ciblant la PI3K ou par ARN d'interférence ciblant AKT.

Le rôle de SHP1 dans le développement du cancer colorectal a également été évalué. Ainsi, nous avons d'abord montré que dans un contexte où *Apc* est muté, la perte de SHP1 exacerbe la polypose, indiquant ainsi que l'expression de SHP1 limite la formation de tumeurs. Bien que la sous-expression de SHP1 dans des cellules cancéreuses colorectales déjà hyperprolifératives n'ait pas réussi à accélérer leur prolifération en 2D, elle a augmenté la capacité de ces cellules à croître en indépendance d'ancrage. De plus, chez les souris *Apc*^{Min/+}, certains polypes semblent être plus gros lorsque SHP1 n'est pas exprimé. Ces deux derniers résultats suggèrent que SHP1 pourrait restreindre la croissance tumorale. Ainsi, il serait intéressant de vérifier l'impact de drogues, démontrées pour augmenter l'activité phosphatase de SHP1 telles que le SC-43 et le SC-78 (Chung et al., 2018; Su et al., 2017), sur la prolifération et la croissance en indépendance d'ancrage des cellules cancéreuses colorectales. Si un effet inhibiteur est observé *in cellulo*, il sera alors pertinent de tester leur impact sur la croissance tumorale en souris immunodéficientes. De plus, suite à la détermination de l'interactôme de SHP1, nous avons trouvé que cette phosphatase serait impliquée dans la régulation positive de la signalisation BMP, connue pour interférer avec la signalisation Wnt/ β -caténine (Freeman et al., 2013; He et al., 2004). Il serait donc pertinent d'approfondir le lien entre SHP1 et la signalisation BMP dans le contexte du cancer colorectal.

Nos résultats chez la souris suggèrent que SHP1 n'est pas un suppresseur de tumeur puisque son absence dans l'épithélium intestinal murin n'induit pas la formation de tumeur avec l'âge. Il serait tout de même important de valider cette observation avec une plus grande cohorte de souris puisque seulement 6 animaux ont été analysés jusqu'à présent à 15 mois. De plus, il serait intéressant de valider par immunobuvardage (niveaux de phosphorylation de AKT sur la sérine 473) si la signalisation PI3K/AKT est toujours hyperactivée chez les

souris de 15 mois, et si la signalisation Wnt/ β -caténine ne l'est plus (niveau d'expression de la β -caténine et de sa forme active, en plus de l'analyse de gènes cibles de la signalisation Wnt/ β -caténine). Également, les mécanismes de compensation par lesquels la signalisation Wnt/ β -caténine pourrait être réprimée avec l'âge devraient être étudiés. Ainsi, l'activation de la signalisation BMP pourrait être particulièrement pertinente à analyser, considérant que les résultats de spectrométrie de masse suggèrent que cette voie de signalisation pourrait être régulée par SHP1. De plus, l'expression et/ou l'activité des protéines composant le complexe de dégradation de la β -caténine pourraient être évalué, de même que celle de E3 ubiquitine ligases connues pour réguler la β -caténine, tel que β -TrCP. Ces données pourraient entre autres mettre en évidence si la signalisation est bloquée naturellement par le complexe de dégradation de la β -caténine ou non. En fonction des résultats obtenus, d'autres pistes pourraient alors être étudiées.

Nous avons aussi investigué l'implication de SHP1 dans la régulation du développement d'inflammation intestinale. L'utilisation d'un modèle de colite chimique induite par le DSS a permis de montrer que SHP1, exprimé dans les entérocytes, protège contre l'inflammation intestinale. Plus précisément, nos résultats montrent que SHP1 prévient l'inflammation dans l'iléon, mais pas dans le côlon. On pourrait donc spéculer que SHP1 pourrait prévenir le développement de l'inflammation intestinale observée lors de la maladie de Crohn. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer la réponse inflammatoire obtenue chez les souris *Shp1*^{CEI-KO}, en comparaison aux souris contrôles, suivant un traitement à l'indométacine. L'indométacine induit des dommages inflammatoires dans l'intestin grêle, contrairement au DSS qui ne s'attaque qu'au côlon (Yamada et al., 2011). Il serait ainsi intéressant d'évaluer chez des souris *Shp1*^{CEI-KO}, la sensibilité de l'épithélium intestinal à l'indométacine ainsi que sa capacité de régénération après le traitement. Il serait aussi intéressant d'étudier davantage le rôle de SHP1 dans la régulation de l'autophagie, qui lorsqu'elle est dérégulée, est connue pour être un facteur de susceptibilité au développement de la maladie de Crohn. D'ailleurs, durant ma maîtrise, nous avons observé que l'activité autophagique semblait être réduite dans l'épithélium intestinal des souris *Shp1*^{CEI-KO} (Leblanc, 2015).

Mes travaux de recherche ont mis en lumière une importance de SHP1 dans le contrôle de l'homéostasie de l'épithélium épithélial, sans toutefois sembler affecter l'épithélium colique. Le rôle de SHP1 sur la signalisation dans l'épithélium colique pourrait être analysé afin de déterminer si les notamment voie Wnt/ β -caténine et PI3K/AKT seraient également régulées par cette phosphatase. Ces analyses permettraient de valider que l'activité de SHP1 dans le côlon est moins importante que dans l'intestin grêle. De plus, il serait important de valider le niveau d'activité de SHP1 tant dans le jéjunum que dans le côlon à l'aide d'une technique plus précise que par la phosphorylation de la sérine 591 de SHP1. Ceci pourrait notamment être fait par une immunoprécipitation de SHP1 suivi d'un test au pNPP, ce qui permettrait notamment de quantifier l'activité phosphatase (Edri et al., 2018).

Mes travaux ont aussi mis en lumière qu'il existe une corrélation entre l'expression de la β -caténine et l'expression de SHP1. En effet, tant dans les lignées colorectales que dans les souris *Apc*^{Min/+}, nous avons noté une corrélation positive entre l'expression protéique de la β -caténine et SHP1. De plus, la simple surexpression de la β -caténine est suffisante pour induire une forte expression de SHP1. Mes résultats suggèrent que cet effet de la β -caténine n'est pas transcriptionnel et se situerait plutôt au niveau du contrôle de la stabilité de la protéine SHP1. Il faudrait faire des analyses plus détaillées de la stabilité de SHP1 en présence et en absence d'expression de la β -caténine et ce, suite à l'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide. Des travaux du laboratoire ont déjà rapporté que suite à sa phosphorylation sur la sérine 591, SHP1 était dégradée par le protéasome. Il serait donc intéressant de vérifier si la phosphorylation sur la sérine 591 est modulée par la surexpression de la β -caténine et si c'est le cas, trouver la kinase responsable. Finalement, il faudrait identifier l'ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitination de SHP1 afin de mettre en lumière le mécanisme d'action permettant à la β -caténine de moduler l'expression de SHP1. Somme tout, mes travaux de recherche semblent montrer pour la première fois un mécanisme de rétrocontrôle de la signalisation Wnt/ β -caténine qui passerait par l'expression de la tyrosine phosphatase SHP1 lorsque les niveaux de β -caténine serait élevés.

En conclusion, mes travaux de recherche ont permis de démontrer que la tyrosine phosphatase SHP1 est un régulateur important du maintien de l'homéostasie générale de

l'épithélium de l'intestin grêle. De plus, nos résultats suggèrent que l'activation de cette phosphatase pourrait s'avérer une avenue thérapeutique intéressante pour limiter voire freiner la progression tumorale et l'inflammation dans l'intestin grêle.

VI. REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier la Pre Nathalie Rivard sans qui tout cela n'aura pas été possible. Dès le début Nathalie a cru en moi et m'a donné ma chance en m'accueillant au sein de son laboratoire. Merci pour ta rigueur et ta confiance, mais surtout, merci pour l'excellente formation que tu m'as donnée.

Ensuite, j'aimerais remercier les membres de mon comité de mentorat : la Pre Nathalie Perreault et le Pr Pedro-Miguel Geraldès. Vous avez non seulement contribué à mon projet en me fournissant les modèles murins nécessaires à une partie de mes recherches, mais vous avez également été présents tout au long de mon parcours aux études graduées. Merci d'avoir pris le temps de me suivre durant toutes ces années, pour tous vos conseils, et maintenant, de prendre le temps de corriger ma thèse. Merci également à la Pre Audrey Claing de prendre le temps d'évaluer ma thèse.

Évidemment, je n'ai pas tout fait ce travail seule. J'ai eu la chance pendant ma thèse de superviser 4 stagiaires : Vanessa Vaillancourt-Lavigueur, Mia Lecours, Dany Dion et Nawel Amhis. Vous avez tous, chacun à votre façon, contribué à mes travaux de recherche, mais également à me faire grandir. Également, j'aimerais remercier ma collègue Jennifer Raisch qui m'a donné aide et support, surtout dans les derniers mois de ma thèse. Je veux te remercier d'avoir cru en moi et de m'avoir proposé notre collaboration mutuelle.

La vie au laboratoire a toujours été très dynamique et agréable. Chaque personne qui en a fait partie y a ajouté sa petite touche personnelle. Katia Beaudry, Anthony Côté-Biron, Jessica Gagné-Sansfaçon, Ariane Langlois, Marie-Josée Langlois, Valérie Lannoy, Steve McManus, Jennifer Raisch et Vanessa Vaillancourt-Lavigueur. Merci pour votre présence au quotidien et pour tous les beaux moments que nous avons vécu ensemble.

Évidemment, je ne peux pas passer à côté de Ariane Langlois, que j'ai eu la chance de rencontrer durant mes études. Ariane, tu es de loin la meilleure amie que je n'ai jamais eue. Avec toi, une bonne (mauvaise) idée n'attend pas l'autre. Nous avons partagé une belle complicité au laboratoire, et je suis bien heureuse qu'elle se poursuive à l'extérieur, et même malgré la distance!

Durant ma thèse, je me suis également immiscée dans l'univers du Roller Derby où j'ai non seulement trouvé un sport gratifiant, mais j'y ai également trouvé des amis et une communauté en or. À travers mes coéquipières et ce sport singulier, j'ai énormément grandi et j'ai pu m'y développer en tant que personne.

Finalement, je tiens à remercier mes parents, Line et Michel, et ma sœur Véronique, qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans mes études. Et évidemment, mon copain James-Adam, qui en toute circonstance m'encourage et me supporte, et qui m'aide à garder les deux pieds sur terre.

VII. LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abram, C.L., Roberge, G.L., Pao, L.I., Neel, B.G., and Lowell, C.A. (2013). Distinct roles for neutrophils and dendritic cells in inflammation and autoimmunity in moth-eaten mice. *Immunity* 38, 489–501.
- Agazie, Y.M., and Hayman, M.J. (2003). Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7875–7886.
- Aliaga, J.C., Deschênes, C., Beaulieu, J.F., Calvo, E.L., and Rivard, N. (1999). Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am. J. Physiol.* 277, G631–641.
- Al-Jamal, H.A.N., Mat Jusoh, S.A., Hassan, R., and Johan, M.F. (2015). Enhancing SHP-1 expression with 5-azacytidine may inhibit STAT3 activation and confer sensitivity in lestaurtinib (CEP-701)-resistant FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia. *BMC Cancer* 15, 869.
- Allaire, J.M., Crowley, S.M., Law, H.T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., and Vallance, B.A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 39, 677–696.
- Alsadeq, A., Hobeika, E., Medgyesi, D., Kläsener, K., and Reth, M. (2014). The role of the Syk/Shp-1 kinase-phosphatase equilibrium in B cell development and signaling. *J. Immunol.* 193, 268–276.
- Andreu, P., Peignon, G., Slomianny, C., Taketo, M.M., Colnot, S., Robine, S., Lamarque, D., Laurent-Puig, P., Perret, C., and Romagnolo, B. (2008). A genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev. Biol.* 324, 288–296.
- Arrington, A.K., Heinrich, E.L., Lee, W., Duldulao, M., Patel, S., Sanchez, J., Garcia-Aguilar, J., and Kim, J. (2012). Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 13, 12153–12168.
- Banville, D., Stocco, R., and Shen, S.-H. (1995). Human Protein Tyrosine Phosphatase 1C (PTPN6) Gene Structure: Alternate Promoter Usage and Exon Skipping Generate Multiple Transcripts. *Genomics* 27, 165–173.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007.
- Barker, N., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes & Development* 22, 1856–1864.

- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* *457*, 608–611.
- Batlle, E., Henderson, J.T., Begthel, H., van den Born, M.M.W., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., et al. (2002). β -Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB/EphrinB. *Cell* *111*, 251–263.
- Benassi, B., Fanciulli, M., Fiorentino, F., Porrello, A., Chiorino, G., Loda, M., Zupi, G., and Biroccio, A. (2006). c-Myc Phosphorylation Is Required for Cellular Response to Oxidative Stress. *Molecular Cell* *21*, 509–519.
- Bernal, C., Aguayo, F., Villarroel, C., Vargas, M., Díaz, I., Ossandon, F.J., Santibáñez, E., Palma, M., Aravena, E., Barrientos, C., et al. (2008). Reprimo as a potential biomarker for early detection in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* *14*, 6264–6269.
- Blache, P., van de Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J.-N., Clevers, H., and Jay, P. (2004). SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J. Cell Biol.* *166*, 37–47.
- Blaj, C., Bringmann, A., Schmidt, E.M., Urbischek, M., Lamprecht, S., Fröhlich, T., Arnold, G.J., Krebs, S., Blum, H., Hermeking, H., et al. (2017). ADNP Is a Therapeutically Inducible Repressor of WNT Signaling in Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* *23*, 2769–2780.
- Bouazid, D., Fourati, H., Amouri, A., Marques, I., Abida, O., Haddouk, S., Ben Ayed, M., Tahri, N., Penha-Gonçalves, C., and Masmoudi, H. (2013). Association of ZAP70 and PTPN6, but Not BANK1 or CLEC2D, with inflammatory bowel disease in the Tunisian population. *Genet Test Mol Biomarkers* *17*, 321–326.
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am. J. Pathol.* *155*, 1033–1038.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., and Kirchner, T. (2001). Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 10356–10361.
- Brar, G.A., and Weissman, J.S. (2015). Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *16*, 651–664.
- Brink, G.R. van den, Barbara, P. de S., and Roberts, D.J. (2001). Epithelial Cell Differentiation--a Matter of Choice. *Science* *294*, 2115–2116.
- Browne, G.J., and Proud, C.G. (2004). A novel mTOR-regulated phosphorylation site in elongation factor 2 kinase modulates the activity of the kinase and its binding to calmodulin. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2986–2997.

- Bruecher-Encke, B., Griffin, J.D., Neel, B.G., and Lorenz, U. (2001). Role of the tyrosine phosphatase SHP-1 in K562 cell differentiation. *Leukemia* 15, 1424–1432.
- Burshtyn, D.N., Shin, J., Stebbins, C., and Long, E.O. (2000). Adhesion to target cells is disrupted by the killer cell inhibitory receptor. *Curr. Biol.* 10, 777–780.
- Butler, M.T., and Wallingford, J.B. (2017). Planar cell polarity in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18, 375–388.
- Cadwell, K., Liu, J., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., et al. (2009). A unique role for autophagy and Atg16L1 in Paneth cells in murine and human intestine. 14.
- Cai, X., Zhu, C., Xu, Y., Jing, Y., Yuan, Y., Wang, L., Wang, S., Zhu, X., Gao, P., Zhang, Y., et al. (2016). Alpha-ketoglutarate promotes skeletal muscle hypertrophy and protein synthesis through Akt/mTOR signaling pathways. *Sci Rep* 6, 26802.
- Campbell, N.A., and Reece, J.B. (2007). *Biology* (Pearson, Benjamin Cummings).
- Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11452–11457.
- Casalino, L., De Cesare, D., and Verde, P. (2003). Accumulation of Fra-1 in ras-transformed cells depends on both transcriptional autoregulation and MEK-dependent posttranslational stabilization. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4401–4415.
- Chao, T.-I., Tai, W.-T., Hung, M.-H., Tsai, M.-H., Chen, M.-H., Chang, M.-J., Shiau, C.-W., and Chen, K.-F. (2016). A combination of sorafenib and SC-43 is a synergistic SHP-1 agonist duo to advance hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Lett.* 371, 205–213.
- Chardin, P., Camonis, J.H., Gale, N.W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M.H., and Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338–1343.
- Chen, D., Zhao, J., Wang, H., An, N., Zhou, Y., Fan, J., Luo, J., Su, W., Liu, C., and Li, J. (2015). Oxytocin evokes a pulsatile PGE2 release from ileum mucosa and is required for repair of intestinal epithelium after injury. *Sci Rep* 5.
- Chen, H.E., Chang, S., Trub, T., and Neel, B.G. (1996). Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3685–3697.
- Chitalia, V., Shivanna, S., Martorell, J., Meyer, R., Edelman, E., and Rahimi, N. (2013). c-Cbl, a ubiquitin E3 ligase that targets active β -catenin: a novel layer of Wnt signaling regulation. *J. Biol. Chem.* 288, 23505–23517.

- Chowdhury, M.K.H., Montgomery, M.K., Morris, M.J., Cognard, E., Shepherd, P.R., and Smith, G.C. (2015). Glucagon phosphorylates serine 552 of β -catenin leading to increased expression of cyclin D1 and c-Myc in the isolated rat liver. *Arch. Physiol. Biochem.* *121*, 88–96.
- Christophi, G.P., Rong, R., Holtzapple, P.G., Massa, P.T., and Landas, S.K. (2012). Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 2342–2356.
- Chung, S.-Y., Chen, Y.-H., Lin, P.-R., Chao, T.-C., Su, J.-C., Shiau, C.-W., and Su, Y. (2018). Two novel SHP-1 agonists, SC-43 and SC-78, are more potent than regorafenib in suppressing the in vitro stemness of human colorectal cancer cells. *Cell Death Discov* *4*, 25.
- Clevers, H. (2013). The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell* *154*, 274–284.
- Clevers, H.C., and Bevins, C.L. (2013). Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu. Rev. Physiol.* *75*, 289–311.
- Collins, J.T., and Badireddy, M. (2019). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., and Sedergran, D.J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* *69*, 238–249.
- Coulombe, G., Leblanc, C., Cagnol, S., Maloum, F., Lemieux, E., Perreault, N., Feng, G.-S., Boudreau, F., and Rivard, N. (2013). Epithelial tyrosine phosphatase SHP-2 protects against intestinal inflammation in mice. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 2275–2284.
- Craggs, G., and Kellie, S. (2001). A Functional Nuclear Localization Sequence in the C-terminal Domain of SHP-1. *J. Biol. Chem.* *276*, 23719–23725.
- Croker, B.A., Lewis, R.S., Babon, J.J., Minter, J.D., Jenne, D.E., Metcalf, D., Zhang, J.-G., Cengia, L.H., O'Donnell, J.A., and Roberts, A.W. (2011). Neutrophils require SHP1 to regulate IL-1 β production and prevent inflammatory skin disease. *J. Immunol.* *186*, 1131–1139.
- Crosnier, C., Stamataki, D., and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 349–359.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* *378*, 785–789.
- Cyster, J.G., and Goodnow, C.C. (1995). Protein tyrosine phosphatase 1C negatively regulates antigen receptor signaling in B lymphocytes and determines thresholds for negative selection. *Immunity* *2*, 13–24.

- Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D.R., and Simon, H.-U. (2002). Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat Med* 8, 61–67.
- Damas, F., Phillips, S.M., Libardi, C.A., Vechin, F.C., Lixandrão, M.E., Jannig, P.R., Costa, L.A.R., Bacurau, A.V., Snijders, T., Parise, G., et al. (2016). Resistance training-induced changes in integrated myofibrillar protein synthesis are related to hypertrophy only after attenuation of muscle damage. *J. Physiol. (Lond.)* 594, 5209–5222.
- Dangelmaier, C., Manne, B.K., Liverani, E., Jin, J., Bray, P., and Kunapuli, S.P. (2014). PDK1 selectively phosphorylates Thr(308) on Akt and contributes to human platelet functional responses. *Thromb. Haemost.* 111, 508–517.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.
- Degirmenci, B., Valenta, T., Dimitrieva, S., Hausmann, G., and Basler, K. (2018). GLI1-expressing mesenchymal cells form the essential Wnt-secreting niche for colon stem cells. *Nature* 558, 449–453.
- Deitrick, J., and Pruitt, W.M. (2016). Wnt/ β Catenin-Mediated Signaling Commonly Altered in Colorectal Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* 144, 49–68.
- Delgado, M.E., Grabinger, T., and Brunner, T. (2016). Cell death at the intestinal epithelial front line. *The FEBS Journal* 283, 2701–2719.
- Deng, Z., Luo, P., Lai, W., Song, T., Peng, J., and Wei, H.-K. (2017). Myostatin inhibits eEF2K-eEF2 by regulating AMPK to suppress protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 494, 278–284.
- Dominique, V., and Francis, L. (1995). Interactions of the scid or beige mutations with the viable motheaten mutation. *Autoimmunity* 22, 199–207.
- Dorofeyev, A.E., Vasilenko, I.V., Rassokhina, O.A., and Kondratiuk, R.B. (2013). Mucosal Barrier in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Gastroenterol Res Pract* 2013.
- Dow, L.E., O'Rourke, K.P., Simon, J., Tschaharganeh, D.F., van Es, J.H., Clevers, H., and Lowe, S.W. (2015). Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. *Cell* 161, 1539–1552.
- Drabsch, Y., and ten Dijke, P. (2012). TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 31, 553–568.
- Dubois, M.-J., Bergeron, S., Kim, H.-J., Dombrowski, L., Perreault, M., Fournès, B., Faure, R., Olivier, M., Beauchemin, N., Shulman, G.I., et al. (2006). The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat. Med.* 12, 549–556.

- Duchesne, C., Charland, S., Asselin, C., Nahmias, C., and Rivard, N. (2003). Negative Regulation of β -Catenin Signaling by Tyrosine Phosphatase SHP-1 in Intestinal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 14274–14283.
- Edri, A., Shemesh, A., Iraqi, M., Matalon, O., Brusilovsky, M., Hadad, U., Radinsky, O., Gershoni-Yahalom, O., Dye, J.M., Mandelboim, O., et al. (2018). The Ebola-Glycoprotein Modulates the Function of Natural Killer Cells. *Front Immunol* 9.
- Erben, U., Loddenkemper, C., Doerfel, K., Spieckermann, S., Haller, D., Heimesaat, M.M., Zeitz, M., Siegmund, B., and Kühl, A.A. (2014). A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 4557–4576.
- van Es, J.H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M.E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., et al. (2005a). Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat. Cell Biol.* 7, 381–386.
- van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., et al. (2005b). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959–963.
- van Es, J.H., Haegbarth, A., Kujala, P., Itzkovitz, S., Koo, B.-K., Boj, S.F., Korving, J., van den Born, M., van Oudenaarden, A., Robine, S., et al. (2012). A critical role for the Wnt effector Tcf4 in adult intestinal homeostatic self-renewal. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1918–1927.
- Esnault, S., Kelly, E.A.B., Shen, Z.-J., Johansson, M.W., Malter, J.S., and Jarjour, N.N. (2015). IL-3 maintains activation of the P90S6K/RPS6 pathway and increases translation in human eosinophils. *J Immunol* 195, 2529–2539.
- Esposito, N., Colavita, I., Quintarelli, C., Sica, A.R., Peluso, A.L., Luciano, L., Picardi, M., Del Vecchio, L., Buonomo, T., Hughes, T.P., et al. (2011). SHP-1 expression accounts for resistance to imatinib treatment in Philadelphia chromosome-positive cells derived from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 118, 3634–3644.
- Evren, S., Wan, S., Ma, X.-Z., Fahim, S., Mody, N., Sakac, D., Jin, T., and Branch, D.R. (2013). Characterization of SHP-1 protein tyrosine phosphatase transcripts, protein isoforms and phosphatase activity in epithelial cancer cells. *Genomics* 102, 491–499.
- Fan, L.-C., Teng, H.-W., Shiau, C.-W., Lin, H., Hung, M.-H., Chen, Y.-L., Huang, J.-W., Tai, W.-T., Yu, H.-C., and Chen, K.-F. (2014). SHP-1 is a target of regorafenib in colorectal cancer. *Oncotarget* 5, 6243–6251.
- Fan, L.-C., Shiau, C.-W., Tai, W.-T., Hung, M.-H., Chu, P.-Y., Hsieh, F.-S., Lin, H., Yu, H.-C., and Chen, K.-F. (2015a). SHP-1 is a negative regulator of epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 34, 5252–5263.
- Fan, L.-C., Teng, H.-W., Shiau, C.-W., Tai, W.-T., Hung, M.-H., Yang, S.-H., Jiang, J.-K., and Chen, K.-F. (2015b). Pharmacological Targeting SHP-1-STAT3 Signaling Is a

- Promising Therapeutic Approach for the Treatment of Colorectal Cancer. *Neoplasia* 17, 687–696.
- Fan, L.-C., Teng, H.-W., Shiau, C.-W., Tai, W.-T., Hung, M.-H., Yang, S.-H., Jiang, J.-K., and Chen, K.-F. (2016). Regorafenib (Stivarga) pharmacologically targets epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Oncotarget* 7, 64136–64147.
- Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G.B., Kobayashi, R., Hunter, T., and Lu, Z. (2007). Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 282, 11221–11229.
- Fang, L., Zhu, Q., Neuenschwander, M., Specker, E., Wulf-Goldenberg, A., Weis, W.I., von Kries, J.P., and Birchmeier, W. (2016). A Small-Molecule Antagonist of the β -Catenin/TCF4 Interaction Blocks the Self-Renewal of Cancer Stem Cells and Suppresses Tumorigenesis. *Cancer Res.* 76, 891–901.
- Farin, H.F., Es, J.H.V., and Clevers, H. (2012). Redundant Sources of Wnt Regulate Intestinal Stem Cells and Promote Formation of Paneth Cells. *Gastroenterology* 143, 1518–1529.e7.
- Fearon, E.R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 479–507.
- Fenderico, N., van Scherpenzeel, R.C., Goldflam, M., Proverbio, D., Jordens, I., Kralj, T., Stryeck, S., Bass, T.Z., Hermans, G., Ullman, C., et al. (2019). Anti-LRP5/6 VHHs promote differentiation of Wnt-hypersensitive intestinal stem cells. *Nat Commun* 10.
- Feng, G.S., Hui, C.C., and Pawson, T. (1993). SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* 259, 1607–1611.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7551–7559.
- Fidalgo, M., Shekar, P.C., Ang, Y.-S., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., and Wang, J. (2011). Zfp281 Functions as a Transcriptional Repressor for Pluripotency of Mouse Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 29, 1705–1716.
- van der Flier, L.G., Haegbarth, A., Stange, D.E., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2009). OLFM4 Is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* 137, 15–17.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435, 964–968.

- Freeman, T.J., Smith, J.J., Chen, X., Washington, M.K., Roland, J.T., Means, A.L., Eschrich, S.A., Yeatman, T.J., Deane, N.G., and Beauchamp, R.D. (2013). Smad4-Mediated Signaling Inhibits Intestinal Neoplasia by Inhibiting Expression of β -Catenin. 17.
- Frescas, D., and Pagano, M. (2008). Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and β -TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 438–449.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* 30, 193–204.
- Fu, G., Casas, J., Rigaud, S., Rybakina, V., Lambolez, F., Brzostek, J., Hoerter, J.A.H., Paster, W., Acuto, O., Cheroutre, H., et al. (2013). Themis sets the signal threshold for positive and negative selection in T-cell development. *Nature* 504, 441–445.
- Galluzzi, L., Spranger, S., Fuchs, E., and López-Soto, A. (2019). WNT Signaling in Cancer Immunosurveillance. *Trends Cell Biol.* 29, 44–65.
- Garneau, H., Paquin, M.-C., Carrier, J.C., and Rivard, N. (2009). E2F4 expression is required for cell cycle progression of normal intestinal crypt cells and colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology* 221, 350–358.
- Gavert, N., Sheffer, M., Raveh, S., Spaderna, S., Shtutman, M., Brabletz, T., Barany, F., Paty, P., Notterman, D., Domany, E., et al. (2007). Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res.* 67, 7703–7712.
- Georges, P.C., Hui, J.-J., Gombos, Z., McCormick, M.E., Wang, A.Y., Uemura, M., Mick, R., Janmey, P.A., Furth, E.E., and Wells, R.G. (2007). Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G1147–1154.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., et al. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226–230.
- Giles, R.H., van Es, J.H., and Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1653, 1–24.
- Green, M.C., and Shultz, L.D. (1975). Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology. *J. Hered.* 66, 250–258.
- Hahn, S., and Hermeking, H. (2014). ZNF281/ZBP-99: a new player in epithelial–mesenchymal transition, stemness, and cancer. *J Mol Med* 92, 571–581.
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., et al. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* 39, 207–211.

- Han, Y., Amin, H.M., Frantz, C., Franko, B., Lee, J., Lin, Q., and Lai, R. (2006a). Restoration of shp1 expression by 5-AZA-2'-deoxycytidine is associated with downregulation of JAK3/STAT3 signaling in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 20, 1602–1609.
- Han, Y., Amin, H.M., Franko, B., Frantz, C., Shi, X., and Lai, R. (2006b). Loss of SHP1 enhances JAK3/STAT3 signaling and decreases proteasome degradation of JAK3 and NPM-ALK in ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 108, 2796–2803.
- Hankey, W., Frankel, W.L., and Groden, J. (2018). Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: Implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev* 37, 159–172.
- Hansen, J., Gulati, A., and Sartor, R.B. (2010). The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 564–571.
- Hao, H.-X., Jiang, X., and Cong, F. (2016). Control of Wnt Receptor Turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 Signaling Module and Its Dysregulation in Cancer. *Cancers (Basel)* 8.
- Haramis, A.-P.G., Begthel, H., Born, M. van den, Es, J. van, Jonkhoeer, S., Offerhaus, G.J.A., and Clevers, H. (2004). De Novo Crypt Formation and Juvenile Polyposis on BMP Inhibition in Mouse Intestine. *Science* 303, 1684–1686.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509–1512.
- He, X.C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., et al. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nat Genet* 36, 1117–1121.
- Helander, H.F., and Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 681–689.
- Hou, J., Kam, F., Proud, C.G., and Wang, S. (2012). Targeting Mnks for Cancer Therapy. *Oncotarget* 3, 118–131.
- Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603.
- Huo, Y.-N., Chen, W., and Zheng, X.-X. (2015). ROS, MAPK/ERK and PKC play distinct roles in EGF-stimulated human corneal cell proliferation and migration. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* 61, 6–11.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 648–657.

- Jaeckel, S., Kaller, M., Jackstadt, R., Götz, U., Müller, S., Boos, S., Horst, D., Jung, P., and Hermeking, H. (2018). Ap4 is rate limiting for intestinal tumor formation by controlling the homeostasis of intestinal stem cells. *Nat Commun* 9, 3573.
- Jarvis, L.A., Toering, S.J., Simon, M.A., Krasnow, M.A., and Smith-Bolton, R.K. (2006). Sprouty proteins are in vivo targets of Corkscrew/SHP-2 tyrosine phosphatases. *Development* 133, 1133–1142.
- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., and Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1172–1183.
- Jiang, X., Charlat, O., Zamponi, R., Yang, Y., and Cong, F. (2015). Dishevelled promotes Wnt receptor degradation through recruitment of ZNRF3/RNF43 E3 ubiquitin ligases. *Mol. Cell* 58, 522–533.
- Johnston, S.B., and Raines, R.T. (2015). Catalysis by the Tumor-Suppressor Enzymes PTEN and PTEN-L. *PLoS One* 10.
- Jones, M.L., Craik, J.D., Gibbins, J.M., and Poole, A.W. (2004). Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *J. Biol. Chem.* 279, 40475–40483.
- Joo, M.K., Park, J.-J., Kim, S.H., Yoo, H.S., Lee, B.J., Chun, H.J., Lee, S.W., and Bak, Y.-T. (2015). Antitumorigenic effect of plumbagin by induction of SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1 in human gastric cancer cells. *Int. J. Oncol.* 46, 2380–2388.
- Joo, M.K., Park, J.-J., Yoo, H.S., Lee, B.J., Chun, H.J., Lee, S.W., and Bak, Y.-T. (2016). Epigenetic regulation and anti-tumorigenic effects of SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP1) in human gastric cancer cells. *Tumor Biol.* 37, 4603–4612.
- Kabiri, Z., Greicius, G., Zaribafzadeh, H., Hemmerich, A., Counter, C.M., and Virshup, D.M. (2018). Wnt signaling suppresses MAPK-driven proliferation of intestinal stem cells. *J. Clin. Invest.* 128, 3806–3812.
- Karin, M., and Clevers, H. (2016). Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* 529, 307–315.
- Kashiwada, M., Giallourakis, C.C., Pan, P.Y., and Rothman, P.B. (2001). Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif of the IL-4 receptor associates with SH2-containing phosphatases and regulates IL-4-induced proliferation. *J. Immunol.* 167, 6382–6387.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., Barrantes, I. del B., Stannek, P., Niehrs, C., and Wu, W. (2004). R-Spondin2 Is a Secreted Activator of Wnt/ β -Catenin Signaling and Is Required for Xenopus Myogenesis. *Developmental Cell* 7, 525–534.
- Khalil, A.M., Cambier, J.C., and Shlomchik, M.J. (2012). B cell receptor signal transduction in the GC is short-circuited by high phosphatase activity. *Science* 336, 1178–1181.

- Kim, C.H., Qu, C.K., Hangoc, G., Cooper, S., Anzai, N., Feng, G.S., and Broxmeyer, H.E. (1999). Abnormal chemokine-induced responses of immature and mature hematopoietic cells from motheaten mice implicate the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in chemokine responses. *J. Exp. Med.* *190*, 681–690.
- Koh, J.S., Joo, M.K., Park, J.-J., Yoo, H.S., Choi, B.I., Lee, B.J., Chun, H.J., and Lee, S.W. (2018). Inhibition of STAT3 in gastric cancer: role of pantoprazole as SHP-1 inducer. *Cell Biosci* *8*, 50.
- Koyama, M., Oka, T., Ouchida, M., Nakatani, Y., Nishiuchi, R., Yoshino, T., Hayashi, K., Akagi, T., and Seino, Y. (2003). Activated proliferation of B-cell lymphomas/leukemias with the SHP1 gene silencing by aberrant CpG methylation. *Lab. Invest.* *83*, 1849–1858.
- Kretzschmar, K., and Clevers, H. (2017). Wnt/ β -catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. *Dev. Biol.* *428*, 273–282.
- Ksiaa, F., Ziadi, S., Amara, K., Korbi, S., and Trimeche, M. (2009). Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. *Clin. Chim. Acta* *404*, 128–133.
- Langlois, M.-J., Roy, S.A.B., Auclair, B.A., Jones, C., Boudreau, F., Carrier, J.C., Rivard, N., and Perreault, N. (2009). Epithelial phosphatase and tensin homolog regulates intestinal architecture and secretory cell commitment and acts as a modifier gene in neoplasia. *FASEB J.* *23*, 1835–1844.
- Langlois, M.-J., Servant, R., Reyes Nicolás, V., Jones, C., Roy, S.A.B., Paquet, M., Carrier, J.C., Rivard, N., Boudreau, F., and Perreault, N. (2019). Loss of PTEN Signaling in Foxl1+ Mesenchymal Telocytes Initiates Spontaneous Colonic Neoplasia in Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* *8*, 530-533.e5.
- Lassen, K.G., Kuballa, P., Conway, K.L., Patel, K.K., Becker, C.E., Peloquin, J.M., Villablanca, E.J., Norman, J.M., Liu, T.-C., Heath, R.J., et al. (2014). Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 7741–7746.
- de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.-K., Li, V.S.W., Teunissen, H., Kujala, P., Haegbarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., et al. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* *476*, 293–297.
- Leblanc, C. (2015). Le rôle de la tyrosine phosphatase Shp-1 dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Mémoire de maîtrise.
- Leblanc, C., Langlois, M.-J., Coulombe, G., Vaillancourt-Lavigne, V., Jones, C., Carrier, J.C., Boudreau, F., and Rivard, N. (2017). Epithelial Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 restrains intestinal growth, secretory cell differentiation, and tumorigenesis. *The FASEB Journal* *31*, 3512–3526.

- Lee, G., Goretsky, T., Managlia, E., Dirisina, R., Singh, A.P., Brown, J.B., May, R., Yang, G.-Y., Ragheb, J.W., Evers, B.M., et al. (2010). Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates beta-catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis. *Gastroenterology* 139, 869–881, 881.e1-9.
- Lemieux, E., Boucher, M.-J., Mongrain, S., Boudreau, F., Asselin, C., and Rivard, N. (2011). Constitutive activation of the MEK/ERK pathway inhibits intestinal epithelial cell differentiation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301, G719-730.
- Li, B.B., Qian, C., Gameiro, P.A., Liu, C.-C., Jiang, T., Roberts, T.M., Struhl, K., and Zhao, J.J. Targeted profiling of RNA translation reveals mTOR-4EBP1/2-independent translation regulation of mRNAs encoding ribosomal proteins. *CELL BIOLOGY* 8.
- Li, J., Liu, X., Chu, H., Fu, X., Li, T., Hu, L., Xing, S., Li, G., Gu, J., and Zhao, Z.J. (2015). Specific dephosphorylation of Janus Kinase 2 by protein tyrosine phosphatases. *Proteomics* 15, 68–76.
- Li, Y., Yang, L., Pan, Y., Yang, J., Shang, Y., and Luo, J. (2014). Methylation and decreased expression of SHP-1 are related to disease progression in chronic myelogenous leukemia. *Oncol. Rep.* 31, 2438–2446.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.-H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., et al. (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature Medicine* 8, 1153.
- Liu, Y., Kruhlak, M.J., Hao, J.-J., and Shaw, S. (2007). Rapid T cell receptor-mediated SHP-1 S591 phosphorylation regulates SHP-1 cellular localization and phosphatase activity. *J. Leukoc. Biol.* 82, 742–751.
- López, I., P Oliveira, L., Tucci, P., Alvarez-Valín, F., A Coudry, R., and Marín, M. (2012). Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. *Gene* 499, 81–87.
- López-Arribillaga, E., Rodilla, V., Pellegrinet, L., Guiu, J., Iglesias, M., Roman, A.C., Gutarra, S., González, S., Muñoz-Cánoves, P., Fernández-Salguero, P., et al. (2015). Bmi1 regulates murine intestinal stem cell proliferation and self-renewal downstream of Notch. *Development* 142, 41–50.
- Lorenz, U. (2009). SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. *Immunol. Rev.* 228, 342–359.
- Ma, H., Morsink, F.H.M., Offerhaus, G.J.A., and de Leng, W.W.J. (2016). Stem cell dynamics and pretumor progression in the intestinal tract. *J Gastroenterol* 51, 841–852.
- Madison, B.B., Dunbar, L., Qiao, X.T., Braunstein, K., Braunstein, E., and Gumucio, D.L. (2002). Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J. Biol. Chem.* 277, 33275–33283.

- Mah, A.T., Yan, K.S., and Kuo, C.J. (2016). Wnt pathway regulation of intestinal stem cells. *J. Physiol. (Lond.)* *594*, 4837–4847.
- Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J., and Cantley, L.C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell* *10*, 151–162.
- Marieb, and Hoehn (2010). *Anatomie et physiologie humaines* (Benjamin Cummings).
- Marsh, V., Winton, D.J., Williams, G.T., Dubois, N., Trump, A., Sansom, O.J., and Clarke, A.R. (2008). Epithelial Pten is dispensable for intestinal homeostasis but suppresses adenoma development and progression after Apc mutation. *Nat Genet* *40*, 1436–1444.
- Marsh Durban, V., Jansen, M., Davies, E.J., Morsink, F.H., Offerhaus, G.J.A., and Clarke, A.R. (2014). Epithelial-specific loss of PTEN results in colorectal juvenile polyp formation and invasive cancer. *Am. J. Pathol.* *184*, 86–91.
- Martinez, R.J., Morris, A.B., Neeld, D.K., and Evavold, B.D. (2016). Targeted loss of SHP1 in murine thymocytes dampens TCR signaling late in selection. *Eur. J. Immunol.* *46*, 2103–2110.
- McGlinchy, N.J., and Ingolia, N.T. (2017). Transcriptome-wide measurement of translation by ribosome profiling. *Methods* *126*, 112–129.
- McManus, E.J., and Alessi, D.R. (2002). TSC1–TSC2: a complex tale of PKB-mediated S6K regulation. *Nature Cell Biology* *4*, E214.
- Mei, Y., Bian, C., Li, J., Du, Z., Zhou, H., Yang, Z., and Zhao, R.C.H. (2013). miR-21 modulates the ERK-MAPK signaling pathway by regulating SPRY2 expression during human mesenchymal stem cell differentiation. *J. Cell. Biochem.* *114*, 1374–1384.
- Menconi, A., Hernandez-Velasco, X., Vicuña, E.A., Kuttappan, V.A., Faulkner, O.B., Tellez, G., Hargis, B.M., and Bielke, L.R. (2015). Histopathological and morphometric changes induced by a dextran sodium sulfate (DSS) model in broilers. *Poult. Sci.* *94*, 906–911.
- Middelhoff, M., Westphalen, C.B., Hayakawa, Y., Yan, K.S., Gershon, M.D., Wang, T.C., and Quante, M. (2017). Dclk1-expressing tuft cells: critical modulators of the intestinal niche? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *313*, G285–G299.
- Miller, J.R. (2002). The Wnts. *Genome Biol.* *3*, REVIEWS3001.
- Miyaki, M., Iijima, T., Konishi, M., Sakai, K., Ishii, A., Yasuno, M., Hishima, T., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T., et al. (1999). Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* *18*, 3098–3103.
- Miyoshi, H. (2017). Wnt-expressing cells in the intestines: guides for tissue remodeling. *J Biochem* *161*, 19–25.

- Mkaddem, S.B., Murua, A., Flament, H., Titeca-Beauport, D., Bounaix, C., Danelli, L., Launay, P., Benhamou, M., Blank, U., Daugas, E., et al. (2017). Lyn and Fyn function as molecular switches that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation. *Nat Commun* 8.
- Monick, M.M., Powers, L.S., Walters, K., Lovan, N., Zhang, M., Gerke, A., Hansdottir, S., and Hunninghake, G.W. (2010). Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages. *J. Immunol.* 185, 5425–5435.
- Montagner, A., Yart, A., Dance, M., Perret, B., Salles, J.-P., and Raynal, P. (2005). A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. *J. Biol. Chem.* 280, 5350–5360.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787–1790.
- Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247, 322–324.
- Moser, A.R., Shoemaker, A.R., Connelly, C.S., Clipson, L., Gould, K.A., Luongo, C., Dove, W.F., Siggers, P.H., and Gardner, R.L. (1995). Homozygosity for the Min allele of Apc results in disruption of mouse development prior to gastrulation. *Dev. Dyn.* 203, 422–433.
- Mundade, R., Imperiale, T.F., Prabhu, L., Loehrer, P.J., and Lu, T. (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience* 1, 400–406.
- Munemitsu, S., Souza, B., Müller, O., Albert, I., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1994). The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res.* 54, 3676–3681.
- Nakase, K., Cheng, J., Zhu, Q., and Marasco, W.A. (2009). Mechanisms of SHP-1 P2 promoter regulation in hematopoietic cells and its silencing in HTLV-1-transformed T cells. *J Leukoc Biol* 85, 165–174.
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 767–779.
- Noah, T.K., and Shroyer, N.F. (2013). Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 263–288.
- Nunes, T., Etchevers, M.J., García-Sánchez, V., Ginard, D., Martí, E., Barreiro-de Acosta, M., Gomollón, F., Arroyo, M., Bastida, G., Gonzalez, B., et al. (2016). Impact of Smoking Cessation on the Clinical Course of Crohn's Disease Under Current Therapeutic Algorithms: A Multicenter Prospective Study. *Am. J. Gastroenterol.* 111, 411–419.
- Nusse, R. (2012). Wnt Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606.
- Oh, S.Y., Zheng, T., Kim, Y.-K., Cohn, L., Homer, R.J., McKenzie, A.N.J., and Zhu, Z. (2009). A critical role of SHP-1 in regulation of type 2 inflammation in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 568–574.
- Oka, T., Ouchida, M., Koyama, M., Ogama, Y., Takada, S., Nakatani, Y., Tanaka, T., Yoshino, T., Hayashi, K., Ohara, N., et al. (2002). Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res.* 62, 6390–6394.
- Onuma, K., Ochiai, M., Orihashi, K., Takahashi, M., Imai, T., Nakagama, H., and Hippo, Y. (2013). Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 11127–11132.
- Pao, L.I., Lam, K.-P., Henderson, J.M., Kutok, J.L., Alimzhanov, M., Nitschke, L., Thomas, M.L., Neel, B.G., and Rajewsky, K. (2007). B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity. *Immunity* 27, 35–48.
- Paquin, M.-C., Cagnol, S., Carrier, J.C., Leblanc, C., and Rivard, N. (2013). ERK-associated changes in E2F4 phosphorylation, localization and transcriptional activity during mitogenic stimulation in human intestinal epithelial crypt cells. *BMC Cell Biol.* 14, 33.
- Park, E.C., Cho, G.-S., Kim, G.-H., Choi, S.-C., and Han, J.-K. (2011). The involvement of Eph-Ephrin signaling in tissue separation and convergence during *Xenopus* gastrulation movements. *Dev. Biol.* 350, 441–450.
- Patursky-Polischuk, I., Stolovich-Rain, M., Hausner-Hanochi, M., Kasir, J., Cybulski, N., Avruch, J., Ruegg, M.A., Hall, M.N., and Meyuhas, O. (2009). The TSC-mTOR Pathway Mediates Translational Activation of TOP mRNAs by Insulin Largely in a Raptor- or Rictor-Independent Manner. *Molecular and Cellular Biology* 29, 640–649.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17, 1709–1713.
- Poole, A.W., and Jones, M.L. (2005). A SHPping tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell. Signal.* 17, 1323–1332.
- Qian, Y., Li, J., and Xia, S. (2017). ZNF281 Promotes Growth and Invasion of Pancreatic Cancer Cells by Activating Wnt/ β -Catenin Signaling. *Dig. Dis. Sci.* 62, 2011–2020.
- Qin, C.-J., Bu, P.-L., Zhang, Q., Chen, J.-T., Li, Q.-Y., Liu, J.-T., Dong, H.-C., and Ren, X.-Q. (2019). ZNF281 Regulates Cell Proliferation, Migration and Invasion in Colorectal Cancer through Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cell. Physiol. Biochem.* 52, 1503–1516.

- Recio-Boiles, A., Waheed, A., and Cagir, B. (2019). Cancer, Colon. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Rieder, F., Brenmoehl, J., Leeb, S., Schölmerich, J., and Rogler, G. (2007). Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* 56, 130–139.
- Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., et al. (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat. Genet.* 39, 596–604.
- Rodríguez-Colman, M.J., Schewe, M., Meerlo, M., Stigter, E., Gerrits, J., Pras-Raves, M., Sacchetti, A., Hornsveld, M., Oost, K.C., Snippert, H.J., et al. (2017). Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature* 543, 424–427.
- Ruffner, H., Sprunger, J., Charlat, O., Leighton-Davies, J., Grosshans, B., Salathe, A., Zietling, S., Beck, V., Therier, M., Isken, A., et al. (2012). R-Spondin Potentiates Wnt/ β -Catenin Signaling through Orphan Receptors LGR4 and LGR5. *PLoS One* 7.
- Ruvinsky, I., and Meyuhas, O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in Biochemical Sciences* 31, 342–348.
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* 19, 2199–2211.
- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.-G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., et al. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 456, 264–268.
- Saju, P., Murata-Kamiya, N., Hayashi, T., Senda, Y., Nagase, L., Noda, S., Matsusaka, K., Funata, S., Kunita, A., Urabe, M., et al. (2016). Host SHP1 phosphatase antagonizes *Helicobacter pylori* CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus. *Nat Microbiol* 1, 16026.
- Sancho, R., Cremona, C.A., and Behrens, A. (2015). Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO Rep.* 16, 571–581.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418.
- Sawa, M., Masuda, M., and Yamada, T. (2016). Targeting the Wnt signaling pathway in colorectal cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 20, 419–429.

- Saxton, T.M., Henkemeyer, M., Gasca, S., Shen, R., Rossi, D.J., Shalaby, F., Feng, G.S., and Pawson, T. (1997). Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *EMBO J.* *16*, 2352–2364.
- Schepers, A.G., Snippert, H.J., Stange, D.E., van den Born, M., van Es, J.H., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2012). Lineage tracing reveals Lgr5⁺ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* *337*, 730–735.
- Schuijers, J., Junker, J.P., Mokry, M., Hatzis, P., Koo, B.-K., Sasselli, V., van der Flier, L.G., Cuppen, E., van Oudenaarden, A., and Clevers, H. (2015). Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts. *Cell Stem Cell* *16*, 158–170.
- Scoville, D.H., Sato, T., He, X.C., and Li, L. (2008). Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling. *Gastroenterology* *134*, 849–864.
- Semēnov, M.V., Tamai, K., Brott, B.K., Kühl, M., Sokol, S., and He, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* *11*, 951–961.
- Seo, K.-W., Roh, K.-H., Bhandari, D.R., Park, S.-B., Lee, S.-K., and Kang, K.-S. (2013). ZNF281 Knockdown Induced Osteogenic Differentiation of Human Multipotent Stem Cells in Vivo and in Vitro. *Cell Transplant* *22*, 29–40.
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.-Y., Bakin, A.V., Baselga, J., and Arteaga, C.L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27 Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nature Medicine* *8*, 1145.
- Shivanna, S., Harrold, I., Shashar, M., Meyer, R., Kiang, C., Francis, J., Zhao, Q., Feng, H., Edelman, E.R., Rahimi, N., et al. (2015). The c-Cbl ubiquitin ligase regulates nuclear β -catenin and angiogenesis by its tyrosine phosphorylation mediated through the Wnt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *290*, 12537–12546.
- Short, S.P., Costacurta, P.W., and Williams, C.S. (2017). Using 3D Organoid Cultures to Model Intestinal Physiology and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* *13*, 183–191.
- Shultz, L.D., Coman, D.R., Bailey, C.L., Beamer, W.G., and Sidman, C.L. (1984). “Viable motheaten,” a new allele at the motheaten locus. I. Pathology. *Am. J. Pathol.* *116*, 179–192.
- Simoneau, M., Boulanger, J., Coulombe, G., Renaud, M.-A., Duchesne, C., and Rivard, N. (2008). Activation of Cdk2 stimulates proteasome-dependent truncation of tyrosine phosphatase SHP-1 in human proliferating intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 25544–25556.
- Simoneau, M., Coulombe, G., Vandal, G., Vézina, A., and Rivard, N. (2011). SHP-1 inhibits β -catenin function by inducing its degradation and interfering with its association with TATA-binding protein. *Cell. Signal.* *23*, 269–279.

- Siqueira, M. da S., Ribeiro, R. de M., and Travassos, L.H. (2018). Autophagy and Its Interaction With Intracellular Bacterial Pathogens. *Front Immunol* 9.
- Slattery, M.L. (2000). Diet, lifestyle, and colon cancer. *Semin. Gastrointest. Dis.* 11, 142–146.
- Smith, K.J., Levy, D.B., Maupin, P., Pollard, T.D., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1994). Wild-type but not mutant APC associates with the microtubule cytoskeleton. *Cancer Res.* 54, 3672–3675.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Song, S., Su, Z., Xu, H., Niu, M., Chen, X., Min, H., Zhang, B., Sun, G., Xie, S., Wang, H., et al. (2017). Luteolin selectively kills STAT3 highly activated gastric cancer cells through enhancing the binding of STAT3 to SHP-1. *Cell Death Dis* 8, e2612.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., and Lechleider, R.J. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767–778.
- Stamos, J.L., and Weis, W.I. (2013). The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Stappenbeck, T.S., and McGovern, D.P.B. (2018). Paneth Cell Alterations in the Development and Phenotype of Crohn's Disease. 7.
- Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 256, 668–670.
- Su, T.-H., Shiau, C.-W., Jao, P., Yang, N.-J., Tai, W.-T., Liu, C.-J., Tseng, T.-C., Yang, H.-C., Liu, C.-H., Huang, K.-W., et al. (2017). Src-homology protein tyrosine phosphatase-1 agonist, SC-43, reduces liver fibrosis. *Sci Rep* 7, 1728.
- Sun, J., Guo, Y., Bie, B., Zhu, M., Tian, H., Tian, J., Li, J., Yang, Y., Ji, F., Kong, G., et al. (2019). Silencing of long noncoding RNA HOXD-AS1 inhibits proliferation, cell cycle progression, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through MEK/ERK pathway. *J. Cell. Biochem.*
- Tenev, T., Keilhack, H., Tomic, S., Stoyanov, B., Stein-Gerlach, M., Lammers, R., Krivtsov, A.V., Ullrich, A., and Böhmer, F.D. (1997). Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera. *J. Biol. Chem.* 272, 5966–5973.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–426.

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., and de Sauvage, F.J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478, 255–259.

Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., Benfante, A., Iovino, F., Biffoni, M., Apuzzo, T., Sperduti, I., Volpe, S., Cocorullo, G., et al. (2014). CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell* 14, 342–356.

Tortelote, G.G., Reis, R.R., de Almeida Mendes, F., and Abreu, J.G. (2017). Complexity of the Wnt/ β -catenin pathway: Searching for an activation model. *Cellular Signalling* 40, 30–43.

Tsui, F.W.L., Martin, A., Wang, J., and Tsui, H.W. (2006). Investigations into the regulation and function of the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase, SHP-1. *Immunol. Res.* 35, 127–136.

Tsui, H.W., Siminovitch, K.A., de Souza, L., and Tsui, F.W. (1993). Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat. Genet.* 4, 124–129.

Tsui, H.W., Hasselblatt, K., Martin, A., Mok, S.C., and Tsui, F.W.L. (2002). Molecular mechanisms underlying SHP-1 gene expression. *European Journal of Biochemistry* 269, 3057–3064.

Uhm, K.-O., Lee, E.S., Lee, Y.M., Park, J.S., Kim, S.J., Kim, B.S., Kim, H.S., and Park, S.-H. (2009). Differential Methylation Pattern of ID4, SFRP1, and SHP1 between Acute Myeloid Leukemia and Chronic Myeloid Leukemia. *J Korean Med Sci* 24, 493–497.

Universalis, E., and Articles, L.G. (2015). Appareil digestif (Les Grands Articles d'Universalis) (Encyclopaedia Universalis).

VanDussen, K.L., Carulli, A.J., Keeley, T.M., Patel, S.R., Puthoff, B.J., Magness, S.T., Tran, I.T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, Å., et al. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* 139, 488–497.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532.

Wang, N., Li, Z., Ding, R., Frank, G.D., Senbonmatsu, T., Landon, E.J., Inagami, T., and Zhao, Z.J. (2006). Antagonism or synergism. Role of tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 21878–21883.

Wang, W., Liu, L., Song, X., Mo, Y., Komma, C., Bellamy, H.D., Zhao, Z.J., and Zhou, G.W. (2011). Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation. *J. Cell. Biochem.* 112, 2062–2071.

- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., and Proud, C.G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase. *EMBO J* 20, 4370–4379.
- Wang, X., Regufe da Mota, S., Liu, R., Moore, C.E., Xie, J., Lanucara, F., Agarwala, U., Pyrdit Ruys, S., Vertommen, D., Rider, M.H., et al. (2014). Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase Activity Is Controlled by Multiple Inputs from Oncogenic Signaling. *Mol Cell Biol* 34, 4088–4103.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808.
- Wen, L.-Z., Ding, K., Wang, Z.-R., Ding, C.-H., Lei, S.-J., Liu, J.-P., Yin, C., Hu, P.-F., Ding, J., Chen, W.-S., et al. (2018). SHP-1 Acts as a Tumor Suppressor in Hepatocarcinogenesis and HCC Progression. *Cancer Res.* 78, 4680–4691.
- Westphalen, C.B., Quante, M., and Wang, T.C. (2017). Functional implication of Dclk1 and Dclk1-expressing cells in cancer. *Small GTPases* 8, 164–171.
- Whittem, C.G., Williams, A.D., and Williams, C.S. (2010). Murine Colitis modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J Vis Exp*.
- Wielenga, V.J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., and Pals, S.T. (1999). Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am. J. Pathol.* 154, 515–523.
- Wlodarski, P., Zhang, Q., Liu, X., Kasprzycka, M., Marzec, M., and Wasik, M.A. (2007). PU.1 Activates Transcription of SHP-1 Gene in Hematopoietic Cells. *J. Biol. Chem.* 282, 6316–6323.
- Wong, V.W.Y., Stange, D.E., Page, M.E., Buczacki, S., Wabik, A., Itami, S., van de Wetering, M., Poulsom, R., Wright, N.A., Trotter, M.W.B., et al. (2012). Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat. Cell Biol.* 14, 401–408.
- Wu, G., and He, X. (2006). Threonine 41 in β -Catenin Serves as a Key Phosphorylation Relay Residue in β -Catenin Degradation [†]. *Biochemistry* 45, 5319–5323.
- Wu, C., Guan, Q., Wang, Y., Zhao, Z.J., and Zhou, G.W. (2003a). SHP-1 suppresses cancer cell growth by promoting degradation of JAK kinases. *J. Cell. Biochem.* 90, 1026–1037.
- Wu, C., Sun, M., Liu, L., and Zhou, G.W. (2003b). The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer. *Gene* 306, 1–12.
- Xian, L., Georgess, D., Huso, T., Cope, L., Belton, A., Chang, Y.-T., Kuang, W., Gu, Q., Zhang, X., Senger, S., et al. (2017). HMGA1 amplifies Wnt signalling and expands the intestinal stem cell compartment and Paneth cell niche. *Nat Commun* 8, 15008.

- Xiong, H., Chen, Z.-F., Liang, Q.-C., Du, W., Chen, H.-M., Su, W.-Y., Chen, G.-Q., Han, Z.-G., and Fang, J.-Y. (2009). Inhibition of DNA methyltransferase induces G2 cell cycle arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells via inhibition of JAK2/STAT3/STAT5 signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 3668–3679.
- Yamada, S., Naito, Y., Takagi, T., Mizushima, K., Hirai, Y., Horie, R., Fukumoto, K., Inoue, K., Harusato, A., Yoshida, N., et al. (2011). Reduced small-intestinal injury induced by indomethacin in interleukin-17A-deficient mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 398–404.
- Yamashita, H., Kotani, T., Park, J.-H., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Ku, Y., and Matozaki, T. (2014). Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. *PLoS ONE* 9, e92904.
- Yan, K.S., and Kuo, C.J. (2015). Ascl2 reinforces intestinal stem cell identity. *Cell Stem Cell* 16, 105–106.
- Yan, K.S., Chia, L.A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J.Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S.C., Amieva, M.R., et al. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 466–471.
- Yang, J., Liu, L., He, D., Song, X., Liang, X., Zhao, Z.J., and Zhou, G.W. (2003). Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.* 278, 6516–6520.
- Yang, W., Tabrizi, M., and Yi, T. (2002). A bipartite NLS at the SHP-1 C-terminus mediates cytokine-induced SHP-1 nuclear localization in cell growth control. *Blood Cells Mol. Dis.* 28, 63–74.
- Yi, T.L., Cleveland, J.L., and Ihle, J.N. (1992). Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol. Cell. Biol.* 12, 836–846.
- Yousefi, S., and Simon, H.-U. (2003). SHP-1: a regulator of neutrophil apoptosis. *Semin. Immunol.* 15, 195–199.
- Yu, Y.R., and Rodriguez, J.R. (2017). Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Seminars in Pediatric Surgery* 26, 349–355.
- Yu, C.C., Tsui, H.W., Ngan, B.Y., Shulman, M.J., Wu, G.E., and Tsui, F.W. (1996). B and T cells are not required for the viable motheaten phenotype. *J. Exp. Med.* 183, 371–380.
- Zhang, Y.-Z., and Li, Y.-Y. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol* 20, 91–99.
- Zhang, J., Somani, A.K., and Siminovich, K.A. (2000a). Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin. Immunol.* 12, 361–378.

Zhang, J., Wu, H., Yi, B., Zhou, J., Wei, L., Chen, Y., and Zhang, L. (2018). RING finger protein 38 induces gastric cancer cell growth by decreasing the stability of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *FEBS Lett.* *592*, 3092–3100.

Zhang, Q., Raghunath, P.N., Vonderheid, E., Odum, N., and Wasik, M.A. (2000b). Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter. *Am. J. Pathol.* *157*, 1137–1146.

Zhang, Q., Wang, H.Y., Marzec, M., Raghunath, P.N., Nagasawa, T., and Wasik, M.A. (2005). STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *PNAS* *102*, 6948–6953.

Zhang, W., Chan, R.J., Chen, H., Yang, Z., He, Y., Zhang, X., Luo, Y., Yin, F., Moh, A., Miller, L.C., et al. (2009). Negative regulation of Stat3 by activating PTPN11 mutants contributes to the pathogenesis of Noonan syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia. *J. Biol. Chem.* *284*, 22353–22363.

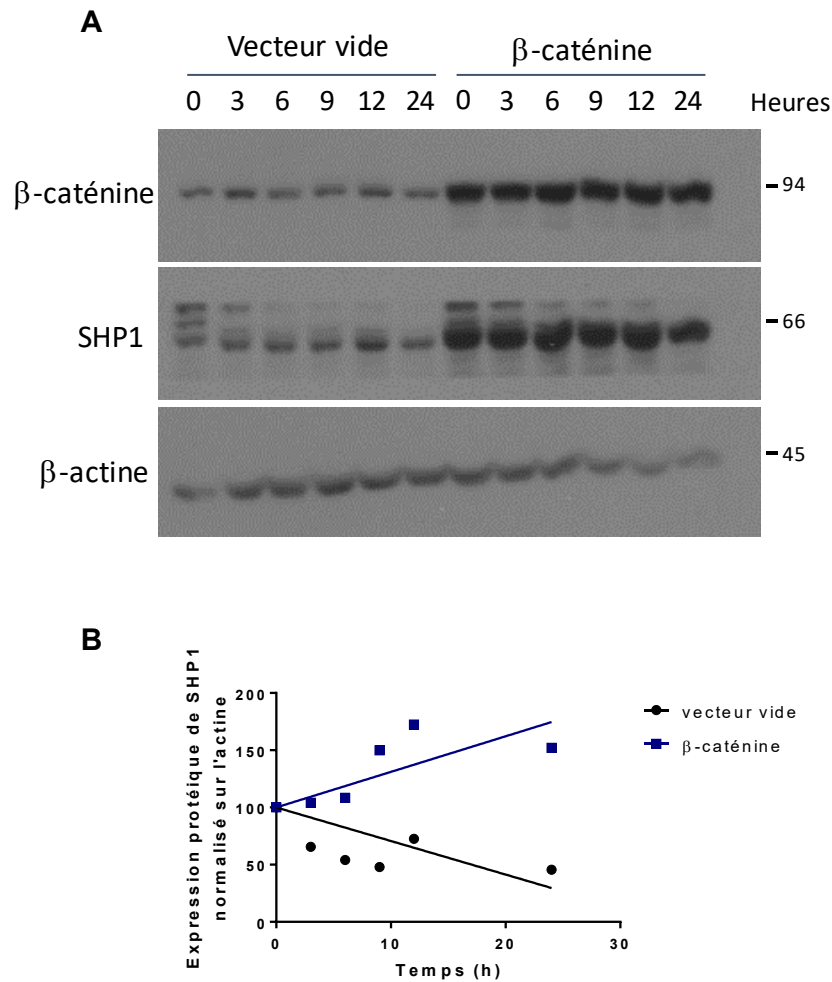
Zhang, Z., Shen, K., Lu, W., and Cole, P.A. (2003). The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation. *J. Biol. Chem.* *278*, 4668–4674.

Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S.K. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* *10*, 1523.

Zhu, L., Gibson, P., Currle, D.S., Tong, Y., Richardson, R.J., Bayazitov, I.T., Poppleton, H., Zakharenko, S., Ellison, D.W., and Gilbertson, R.J. (2009). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* *457*, 603–607.

Zimmer, M., Palmer, A., Köhler, J., and Klein, R. (2003). EphB–ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nature Cell Biology* *5*, 869.

VIII. ANNEXE 1



Annexe 1. SHP1 est stabilisée par l'expression de la β -caténine.

A. Des cellules 293T ont été transfectées avec un vecteur vide, ou un plasmide exprimant la β -caténine. Un traitement à la cycloheximide (CHX) a été effectué et les cellules ont été lysées à 0, 3h, 6h, 9h, 12h et 24h sur ces populations de cellules. L'expression de la β -caténine et de SHP1 a été évalué par immunobuvardage. La β -actine a servi de contrôle de charge. n=1 **B.** La stabilité protéique de SHP1 a été évaluée par son expression normalisée sur l'actine. Une régression linéaire permet de visualiser la demi-vie de SHP1.